

Luciana de Magalhães Leite

**IMUNIDADE INATA EM CÃES COM INFECÇÃO NATURAL PELA
*LEISHMANIA SPP.***

BRASÍLIA/DF

2014

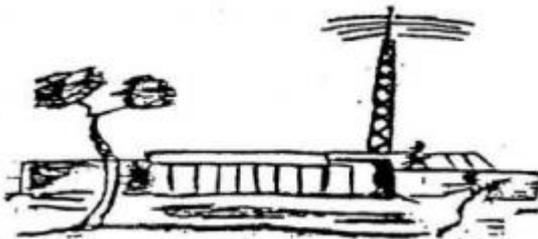
Luciana de Magalhães Leite

**IMUNIDADE INATA EM CÃES COM INFECÇÃO NATURAL PELA
*LEISHMANIA SPP.***

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Co-Orientador: Prof^o Dr^o Gustavo Adolfo Sierra Romero



BRASÍLIA/DF

2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1020741.

L533i Leite, Luciana de Magalhães.
Imunidade inata em cães com infecção natural pela
Leishmania spp. / Luciana de Magalhães Leite. -- 2014.
83 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,
Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2014.

Inclui bibliografia.

Orientação: Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira ;
Co-orientação: Gustavo Adolfo Sierra Romero.

1. Leishmaniose. 2. Cão. 3. Fagocitose. 4. Óxido nítrico.
5. Peróxido de hidrogênio. I. Junqueira, Maria Imaculada
Muniz Barboza. II. Romero, Gustavo Adolfo Sierra.
III. Título.

CDU 616.993.161

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Luciana de Magalhães Leite

IMUNIDADE INATA EM CÃES COM INFECÇÃO NATURAL PELA *Leishmania spp.*

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Medicina Tropical: Epidemiologia e Controle de Doenças infecciosas e
Parasitárias

DATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

18 de dezembro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira – Universidade de Brasília
(Presidente)

Dr Carlos dos Santos Kückelhaus - Fundação Hospitalar do Distrito Federal
(Membro externo)

Prof Dr Cleudson Nery de Castro – Universidade de Brasília
(Membro interno)

Profª Drª Selma Aparecida Souza Kückelhaus – Universidade de Brasília
(Suplente)

DEDICATÓRIA

Aos meu Pais Nelson (in memoriam) e Ana Rita.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sem o amor e a ajuda incondicional que deles recebi, eu não conseguiria ter chegado até aqui.

À minha família, materna e paterna, pelo incentivo e pelo apoio recebido em momentos muito difíceis. Vocês foram ótimos! Muito obrigada.

À minha Orientadora Professora Dr^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, pelo privilégio de ser sua aluna e por ter me ensinado muito mais que imunologia. Serei eternamente grata!

Ao Professor Dr. Gustavo Romero, minha profunda admiração.

A Professora Dr^a Selma Aparecida Souza Kückelhaus, que muito me ensinou tanto em aspectos profissionais quanto no apoio pessoal.

Ao Professor Emérito Carlos Eduardo Tosta, por ter a oportunidade de participar do seu legado.

Ao Professor Dr Gilberto de Freitas (*in memoriam*), que infelizmente não conheci pessoalmente, mas foi uma fonte de inspiração.

A Professora Dr^a Tatiana Karla Borges por sua amizade e incentivo.

A Professora Dr^a Érica Alessandra Alves Rocha, pelo exemplo a ser seguido.

Ao Professor Dr. Cleudson Nery e ao Professor Dr Carlos Kückelhaus, obrigada por aceitarem participar como membros da defesa da minha dissertação de mestrado. É uma honra tê-los na banca.

Aos médicos veterinários da DIVAL Laurício Monteiro, Fred, Anderson, Jadir Filho, por todo o suporte que me deram durante as coletas das amostras utilizadas em meu trabalho.

À médica veterinária Denise Salgado, obrigada por ter me apresentado a *Leishmania* sp e pela realização dos exames da bioquímica e hemograma utilizados neste trabalho.

Agradeço ao meu amigo Danilo Corazza, pela forma surpreendente como me ajudou.

À minha amiga Daniela Aquino, por todos esses anos que passamos juntas, pelas dificuldades que enfrentamos e pelas alegrias que tivemos.

À minha amiga Thaís Minuzzi, sempre me ajudando, até mesmo sem eu saber.

A minha amiga Mayara Oliveira, por me ajudar nas horas mais improváveis.

À Elisabete Abrão, por sua disposição e dedicação em me ajudar durante os experimentos

À minha amiga Graciene Araújo, com quem aprendi tanto, obrigada pela oportunidade.

À minha amiga Henda Aline Vasconcelos, que tanto me incentivou e me ajudou, mesmo estando alguns mil quilômetros distante.

Agradeço aos meu amigos laboratoriais: Andrea Cascaes, André Cunha, Bruna Ester, Daniela Aquino, Danilo Corazza, Elisabete Abrão, Graciene Araújo, Leila Mizokami, Marcelo Nóvoa, Mariana Vieira , Mayara Oliveira, Tatiana Borge, Thaís Minuzzi. Todos me ensinaram muito!

À Professora Dr^a Maria Regina Fernandes, sempre acolhedora, obrigada pelo carinho!

À Professora Dr^a Luciana Flanery, muito querida e me incentivou muito a entrar no mestrado no Programa da Medicina Tropical.

Aos Professores do NMT: Professora Dr^a Nadjar Nitz, Professor Dr Rodrigo Gurgel, Professora Dr^a Eleusa Machado, Professora Dr^a Cecília Fiuza, Professor Dr André Nicola, Professor Dr Mauro Niskier, Professora Dr^a Elisabeth Duarte, Professor Dr Pedro Tauil, Professor Dr Cleudson Nery, Professora Dr^a Elza Noronha, Professor Dr Wildo Navegantes.

Aos Professores da Área de Saúde Coletiva: Professora Dr^a Daphne Rattner e Professora Dr^a Margarita Urdaneta.

Às secretárias do NMT Lúcia Martins, Monique Freitas e Ana Karina Brito. Em especial a Lucia que me ajudou muito com a parte burocrática.

Aos técnicos Nelson Pellet (*in memoriam*), Renata Ribeiro e Maria da Glória sempre muito prestativos.

Aos meus colegas do Núcleo de Medicina Tropical Oscar Lapouble, Carmem Muricy, Roberto Dusi, Arthur Yuri, Edvar Yuri, todos muito companheiros nas horas boas e a nas ruins deste caminho, sempre incentivando com muita força, Aline Rapello, Glauco Machado, Juliana Rossi, Ricardo Gadelha, Lucas Donato, Rebeca Cardoso, Camille Moraes, Leandro Machado e aos colegas de outros programas Daniel Samartino, Viviane Fragoso.

Ao meu amigo Gustavo Antonio Figueredo Barbosa e a minha amiga Sonaira Francisca que pela amizade e companheirismo em momentos muito difíceis.

À Shirley Claudino, Débora Pereira e Danielle Sena que ajudaram na realização dos experimentos da fagocitose e NBT.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Parasito e ciclo biológico.....	3
1.2. Medidas de controle.....	6
1.3. Aspectos clínicos da leishmaniose canina.....	6
1.4. Imunidade para <i>Leishmania. spp</i> no cão.....	8
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Tipo de estudo e delineamento experimental.....	18
4.2 Grupos de estudos.....	19
4.3 Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Parâmetros clínicos e laboratoriais dos cães estudados.....	32
5.1.2 Dados da bioquímica do sangue nos animais com leishmaniose e controles normais.....	34
5.1.3 Hemograma dos animais com leishmaniose e controles normais.....	35
5.2 Avaliação da função fagocitária.....	38
5.2.1 Fagocitose por neutrófilos.....	38
5.2.2 Fagocitose por monócitos.....	44
5.2.3 Fagocitose por monócitos em placa.....	50
5.3. Avaliação da produção de radicais de oxigênio pelo teste do NBT.....	56
5.4 Produção de óxido nítrico.....	57
5.5 Produção de Peróxido de hidrogênio.....	59
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
9. ANEXOS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma.....	18
Figura 2. Figura demonstrativa de úlcera na pele.....	31
Figura 3. Figura demonstrativa de lesão em descamação em animal do grupo com leishmaniose.....	31
Figura 4. Figura demonstrativa de onicogribose em animal do grupo com leishmaniose.....	32
Figura 5. Figura demonstrativa de lesões oculares e tegumentares em animal do grupo com leishmaniose.....	32
Figura 6. Figura demonstrativa de lesões ao redor dos olhos em animal do grupo com leishmaniose.....	32
Figura 7. Capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania spp.</i> em comparação com controles normais, utilizando 20 leveduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) não sensibilizadas por neutrófilo.....	39
Figura 8. Capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania spp.</i> em comparação com controles normais, utilizando 5 leveduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) não sensibilizadas por neutrófilo.....	40
Figura 9. Capacidade fagocitária de neutrófilos de cães naturalmente infectados pela <i>Leishmania spp.</i> , pelos receptores para complemento e fração Fc da imunoglobulina.....	42
Figura 10. Capacidade fagocitária de neutrófilos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas.....	43
Figura 11. Capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, utilizando 5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não sensibilizadas por monócito.....	44
Figura 12. Capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, utilizando 20 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não sensibilizadas por monócito.....	45
Figura 13. Capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas, utilizando 5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por monócito.....	47

Figura 14. Capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas, utilizando 20 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por monócito.....	48
Figura 15. Capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, utilizando 5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não sensibilizadas por monócito, em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania spp.</i> em comparação a de cães controle normal.....	49
Figura 16. Capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, utilizando 10 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não sensibilizadas por monócito, em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania spp.</i> em comparação a de cães controle normal.....	50
Figura 17. Capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas, utilizando 5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por monócito, comparada com a de cães controle normal.....	51
Figura 18. Capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas, utilizando 10 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por monócito, comparada com a de cães controle normal.....	52
Figura 19. Porcentagem de redução basal do NBT pelos fagócitos de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania spp.</i> em comparação com cães controle normal.....	53
Figura 20. Porcentagem de redução basal do NBT pelos fagócitos de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania spp.</i> em comparação com cães controle normal.....	53
Figura 21. Produção de Óxido nítrico em cães controles normais estimulados com 1µg/mL de LPS em relação à produção basal de óxido nítrico de cães controles normais e de cães com leishmaniose estimulados e não estimulados com 1µg/mL de LPS.....	54
Figura 22. Produção de Óxido nítrico em cães controles normais estimulados com 5µg/mL de LPS em relação à produção basal de óxido nítrico de cães controles normais e de cães com leishmaniose estimulados e não estimulados com 5µg/mL de LPS.....	55
Figura 23. Produção de Peróxido de hidrogênio em em cães controles normais estimulados com 200nM de PMA em relação à produção basal peróxido de hidrogênio de cães controles normais e de cães com leishmaniose estimulados e não estimulados com 200nM de PMA.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros clínicos apresentados por 11 cães com leishmaniose...33

Tabela 2. Parâmetros da bioquímica do sangue de cães com leishmaniose (n=11) e controles normais (n=11).....34

Tabela 3. Parâmetros hematológicos (série vermelha) de cães com leishmaniose (n=11) e controles normais (n=11).....36

Tabela 4. Parâmetros hematológicos (série branca) de cães com leishmaniose (n=11) e controles normais. (n=11).....37

LISTA DE ABREVIATURAS

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IF - Índice fagocitário

IFN- γ - Interferon gama

iNOS - Sintase do óxido nítrico

LPS - Lipopolissacarídeo

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

NaOH - Hidróxido de sódio

NBT- Nitroblue tetrazolium

NO - Óxido nítrico

O₂⁻ - Ânion superóxido

PAMP - Padrões moleculares de patógenos

PMA - Acetato miristato de forbol

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium

STF - Salina tamponada com fosfato

SFB - Soro fetal bovino

Ta1 - T auxiliar tipo 1

Ta2 - T auxiliar tipo 2

Ta17 - T auxiliar tipo 17

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

As leishmanioses representam um complexo de doenças com uma importante diversidade clínica e epidemiológica. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose endêmica no Brasil, anteriormente restrita a áreas rurais, mas, recentemente tem ocorrido expansão no processo de urbanização da Leishmaniose Visceral. A imunidade inata participa dos mecanismos de defesa contra a leishmânia e ainda está pouco compreendida na leishmaniose canina. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imunitária inata dos fagócitos de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação com cães normais, pela avaliação da fagocitose e capacidade de produzir moléculas microbicidas. Foram utilizados 30 cães, sem raça definida, maiores que um ano de idade, sendo 22 cães machos e 8 fêmeas, que foram distribuídos em dois grupos: 15 cães não infectados utilizados como controle normal e 15 cães naturalmente infectados pela *Leishmania spp.* Foram feitos o exame clínico, o hemograma e os testes bioquímicos. Foram avaliadas a fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* pelos neutrófilos e monócitos do sangue periférico, pelos receptores para padrões moleculares de patógenos e pelos receptores para opsoninas. A produção de ânions superóxido foi avaliada pelo teste do NBT, a produção de peróxido de hidrogênio pela oxidação do vermelho neutro na presença de peroxidase e a produção de óxido nítrico foi quantificada pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas utilizando reagente de Griess, estimuladas ou não com LPS. Os cães com leishmaniose apresentaram os seguintes sinais clínicos característicos da doença: alopecia (33%), descamação (46%), úlcera na pele (20%), onicogribose (26%), caquexia (46%), linfadenomegalia (40%), ceratoconjuntivite (53%). Os cães com leishmaniose apresentaram anemia normocrômica e normocítica, plaquetopenia e leucopenia, com neutrofilia relativa e desvio à esquerda. Os cães com leishmaniose apresentaram diminuição da atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) em relação a cães normais. Não foram observadas diferenças na concentração sérica da creatinina. As proteínas totais (PT) mostraram-se aumentadas em cães com leishmaniose as custas do aumento das globulinas, sendo que não houve diferença na concentração sérica de albumina entre cães com leishmaniose e cães normais. Cães com leishmaniose apresentaram menor capacidade fagocitária pelos neutrófilos do que cães normais quando avaliados pelos

receptores para padrões moleculares de patógenos. A fagocitose facilitada por opsoninas mostrou que o número de leveduras ingeridas por neutrófilo foi maior em cães com leishmaniose em relação aos controles normais. Não houve diferença entre a capacidade fagocitária pelos monócitos de cães com leishmaniose e cães controle normal quando avaliados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, nas proporções de 5 ou 20 leveduras não sensibilizadas por monócito. Monócitos de cães com leishmaniose apresentaram maior capacidade fagocitária em comparação aos de cães normais, quando avaliados pelos receptores para opsoninas, tanto na proporção de 5 quanto na proporção de 20 leveduras sensibilizadas por monócito. A porcentagem de redução do NBT basal pelos fagócitos de cães com leishmaniose foi menor do que a dos cães controle. Quando utilizamos a concentração de 5 µg/mL de LPS, observamos que cães controles normais apresentaram um aumento da produção de óxido nítrico em relação aos cães controles normais. Entretanto, nos cães com leishmaniose houve diminuição na produção de óxido nítrico quando estimulados com 5 µg/mL de LPS em relação a sua produção basal. Observamos maior produção basal de peróxido de hidrogênio pelos cães com leishmaniose. Nossos resultados mostraram que há uma deficiência dos neutrófilos de cães com leishmaniose tanto na fagocitose quanto na produção de moléculas microbicidas, como os ânions superóxido. Entretanto, os monócitos desses cães embora apresentem uma maior capacidade fagocitária do que os cães normais, mostram uma menor capacidade de produzir óxido nítrico, que é uma das principais moléculas microbicidas para as leishmânias. Estas alterações do sistema imunitário inato podem favorecer o escape do parasito do sistema imunitário do hospedeiro, assim perpetuando sua sobrevivência. Ademais, o aumento da produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos, pode estar contribuindo para restringir em parte a multiplicação do parasito, mas o seu excesso pode também estar contribuindo nos mecanismos de imunopatogenia. Nossos dados contribuem para uma maior compreensão dos mecanismos de defesa da imunidade inata e da imunopatogenia da leishmaniose em cães e podem contribuir para a busca de novos alvos para drogas imunomoduladoras que possam auxiliar no tratamento contra a leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis represent a complex disease with a significant clinical and epidemiological diversity. The Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a zoonosis endemic in Brazil, previously restricted to rural areas, but recently there has been expansion in the urbanization process of Visceral Leishmaniasis. Innate immunity participates in the defense mechanisms against *Leishmania* and is still poorly understood in canine leishmaniasis. The objective of this study was to evaluate the innate immune response of phagocytes of naturally infected dogs to *Leishmania spp.* compared to healthy dogs, and to evaluate phagocytosis and microbicide molecule production by phagocytes. Thirty dogs, mixed breed, higher than one year old, 22 males and 8 females, were separated into two groups: 15 uninfected dogs used as healthy control, 15 dogs naturally infected by *Leishmania spp.* The clinical examination, the blood cell count and biochemical tests were assessed. Phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by neutrophils and monocytes were assessed through pathogen-associated molecular pattern and opsonin receptors. The production of superoxide anions was assessed by the NBT test. Hydrogen peroxide production was evaluated by neutral red oxidation and nitric oxide production by the Griess reagent, with or without LPS. *Leishmania* infected-dogs showed the following clinical characteristics: alopecia (33%), peeling (46%), skin ulcers (20%), onychogryphosis (26%), cachexia (46%), lymphadenopathy (40%), keratoconjunctivitis (53%). *Leishmania* infected-dogs showed normochromic and normocytic anemia, thrombocytopenia and leukopenia with neutrophil relative increment and a left shift. *Leishmania* infected- dogs showed decreased serum activities of alanine aminotransferase (ALT) compared to healthy control. No differences were observed in serum creatinine. The total protein (TP) was increased in *Leishmania* infected-dogs due to an increase in globulins, and there was no difference in serum albumin concentration between dogs with leishmaniasis and healthy controls. *Leishmania* infected-dogs showed lower phagocytic capacity by neutrophils than healthy dogs when evaluated by pathogen-associated molecular pattern receptors. Phagocytosis facilitated by opsonins showed that the number of ingested yeast per neutrophil was higher in *Leishmania* infected-dogs when

compared to healthy controls. There was no difference between the phagocytic capacity of monocytes by *Leishmania* infected-dogs and healthy control when evaluated by pathogen-associated molecular pattern receptors. Monocytes from leishmaniasis animals showed higher phagocytic capacity when compared with healthy dogs, as assessed by the opsonin receptors. NBT percent reduction was lower in leishmaniasis than control dogs. When the concentration of 5 mg / mL of LPS was use, it was observed that healthy control dogs showed an increase in nitric oxide production when compared to control dogs. However, in dogs with leishmaniasis decreased nitric oxide production was observed when monocytes were stimulated with 5 / ml LPS. Higher baseline production of hydrogen peroxide by dogs with leishmaniasis was observed. Our results showed that there is a deficiency in neutrophils of *Leishmania* infected-dogs, both to phagocytosis as production of microbicidal molecules, such as superoxide anions. However, monocytes from leishmaniasis animals showed a higher phagocytic capacity than healthy dogs, showed a decreased capability to produce nitric oxide, which is a major microbicides molecule to *Leishmania*. These changes in innate immune system may favor the parasite scape from host immune system, thus maintaining their survival. In addition, the increased production of hydrogen peroxide by monocytes may contribute to impair the growth of parasites, but its excessive production may contribute to the immunopathogenesis of the disease. Our data contribute to enhance the understanding of the defense mechanisms of innate immunity and the immunopathogenesis of the disease in dogs. This knowledge may contribute as new targets for immunomodulatory drugs improving treatment against leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grupo de doenças com uma importante diversidade clínica e epidemiológica. É um importante problema de saúde humana e veterinária e de saúde pública devido não apenas a fatores de risco ambientais, tais como migrações, urbanização, desmatamento, novos esquemas de irrigação, mas também a fatores individuais de risco: o VIH, desnutrição, a suscetibilidade genética, etc. As leishmanioses fazem parte de um grupo de doenças que ainda exigem aperfeiçoamento das ferramentas de controle (Dantas-Torres 2007; Dantas-Torres et al. 2012; Desjeux 2004).

A leishmaniose humana pode ter várias expressões clínicas, que dependem de características do parasito e do hospedeiro: a forma visceral, que é considerada grave pelo risco de morte se não tratada, a cutânea, a forma mais comum, a mucocutânea e a forma cutâneo difusa, estão presentes em mais de 98 países. Mais de 90% dos casos de Leishmaniose Visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. A Leishmaniose Tegumentar é mais amplamente distribuída nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e Ásia. Os dez países com maior número de casos são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, que juntos representam 70 a 75% da incidência global estimada para Leishmaniose Tegumentar (WHO 2013).

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários e pertencem a família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*. Existem dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, que foram classificados de acordo com o local do desenvolvimento do parasito no vetor. No primeiro a reprodução ocorre nos intestinos médio e anterior, no segundo há uma fase adicional para desenvolvimento que ocorre no intestino posterior (Dantas-Torres, 2007; Michalick & Ribeiro, 2011; Silva & Prata, 2013).

A Leishmaniose Tegumentar é uma zoonose que acomete os seres humanos e diversas espécies de animais domésticos, sinantrópicos e silvestres. O agente etiológico é dermatotrópico, e dependendo da espécie envolvida, as lesões podem ser observadas na pele e/ou mucosas com diferentes manifestações clínicas locais e disseminadas (Michalick & Ribeiro, 2011; Silva & Prata, 2013). No Brasil, várias espécies são encontradas infectando seres humanos e animais, sendo que as mais importantes são

Leishmania (Viannia) braziliensis, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Brasil, 2010).

Já foram relatados casos de infecção natural por *L. (Viannia) braziliensis* em cães, gatos, equídeos, roedores e gambás. Há uma tendência crescente em considerar os cães como principal reservatório doméstico de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o agente etiológico mais comum de Leishmaniose Tegumentar Americana (Dantas-Torres 2007; Reithinger et al. 1999).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania (leishmania) chagasi* ou *Leishmania (leishmania) infantum*. Está presente em regiões da Europa, África, Ásia e América (Baneth et al. 2008). Pode ser observada em regiões tropicais e subtropicais, mas também pode ocorrer em países de clima temperado (Moshfe et al. 2009).

É uma doença endêmica no Brasil, anteriormente restrita a áreas rurais, mas nos últimos dez anos, ocorreu expansão no processo de urbanização da Leishmaniose Visceral, ocasionada por ações antropogênicas desordenadas que resultaram em alterações ambientais facilitando a presença do vetor em áreas domiciliares e peridomiciliares (Brasil 2010).

A principal forma de transmissão é pela picada de flebótomos fêmeas da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, sendo a espécie *Lutzomia longipalpis* o vetor mais importante no Brasil. O cão é o principal reservatório doméstico, sendo que as raposas e marsupiais são considerados os reservatórios silvestres (Gontijo & Mello 2004). O período de incubação em cães naturalmente infectados é extremamente variável, pode ocorrer em meses até dois anos ou mais (Moshfe et al. 2009; Michalick & Ribeiro, 2011). A importância desta doença nos cães baseia-se no fato de que a enzootia canina precede os casos de Leishmaniose Visceral Humana (Brasil 2010).

1.1 Parasito e ciclo biológico

O Complexo *Leishmania-Donovani* é formado por protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. É composto por três subespécies: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Badaró & Duarte, 2005; Michalick & Ribeiro, 2011; Silva & Prata, 2013). A *Leishmania (Leishmania) donovani* infecta seres humanos adultos e é transmitida pelo vetor antropofílico *Phlebotomus*

argentipes. Não possui reservatório animal e a transmissão é inter-humana. A doença é conhecida como Leishmaniose Visceral ou Calazar Indiano, sendo encontrada principalmente em países asiáticos como Índia, Paquistão e Bangladesh (Rey 2001).

A *Leishmania (Leishmania) infantum* pode infectar seres humanos adultos, mas ocorre preferencialmente em crianças, em países do Mediterrâneo, do norte da Ásia e África Oriental. É conhecida como Calazar Infantil e o seu vetor também é o *Phlebotomus*, porém as espécies flebotomíneas são zooantropofílicas. O cão doméstico, canídeos silvestres e roedores são os principais reservatórios (Badaró & Duarte 2005; Rey 2001).

A *Leishmania (Leishmania) chagasi* é o agente etiológico da Leishmaniose Visceral das Américas ou Calazar Americano, que afeta crianças e adultos, mas o vetor pertence ao gênero de dípteros denominados *Lutzomyia*. Os cães parasitados podem ou não desenvolver a doença, atuando como reservatórios para a infecção dos flebotomos em regiões endêmicas (Badaró & Duarte 2005; Baneth et al. 2008; Silva & Prata, 2013; Michalick & Ribeiro, 2011; Rey 2001).

Alguns autores têm sugerido que a *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* seriam muito similares e sua origem nas Américas teria ocorrido pela entrada na América de cães infectados trazidos por imigrantes europeus. Estudos com métodos enzimáticos e genéticos demonstraram que suas diferenças são ínfimas, não permitindo sua identificação como espécies diferentes (Baneth et al. 2008; Dantas-Torres & Brandão Filho 2006; Ferreira et al. 2007; Maurício et al. 2000; Rey 2001; Solano-Gallego et al. 2009), entretanto este tema ainda não é consenso entre os pesquisadores (Silva & Prata, 2013). Nos vertebrados, os parasitos da Leishmaniose Visceral apresentam-se na forma amastigota com aproximadamente 2,1µm de diâmetro, possuem núcleo e cinetoplasto. São viscerotrópicos e localizam-se preferencialmente em células do sistema fagocitário de órgãos linfoides, do baço, fígado e medula óssea (Evans & Rebêlo 1996; Rey 2001).

Nos invertebrados, os parasitos apresentam-se na forma promastigota metacíclica com morfologia losangular alongada e aproximadamente 15 µm a 28 µm de comprimento, possuem na sua porção anterior um flagelo prolongado

As formas promastigotas possuem citoplasma, núcleo, cinetoplasto e flagelo, sendo este último importante para mobilidade do parasito, e são encontradas no tubo digestivo do vetor (Fortes 1997; Michalick & Ribeiro, 2011).

O ciclo do parasito *Leishmânia* inicia-se quando o flebotomíneo regurgita formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes, pela picada na pele de um hospedeiro mamífero, durante o repasto sanguíneo. A picada do flebótomo na pele induz uma rápida infiltração de neutrófilos e substâncias envolvidas no recrutamento de macrófagos. Este processo inflamatório ocorre independente da presença do parasito, resultando da lesão tecidual pela picada do vetor (Beattie & Kaye 2011). A saliva do vetor possui substâncias que promovem a vasodilatação e imunomodulação no hospedeiro, diminuindo a resposta inflamatória facilitando a inoculação do parasito (Svensjö et al. 2009).

Por outro lado, quando o flebotomíneo pica o ser humano ou um animal infectado com *Leishmânia*, ocorre a infecção do vetor pelo parasito, e as formas amastigotas ingeridas diferenciam-se em promastigotas e multiplicam-se no intestino do vetor por divisão binária (Fortes 1997; Badaró & Duarte 2005; Rey 2001).

Ao picar outro ser humano ou animal sadio, os flebotomíneos infectados inoculam formas promastigotas que perdem seus flagelos ao parasitarem macrófagos, diferenciando-se em formas amastigotas. A multiplicação das formas amastigotas ocorre por divisão binária no citoplasma de monócitos e macrófagos dos hospedeiros até que haja ruptura celular e, conseqüentemente, invasão de outras células (Fortes 1997; Dantas-Torres 2009; Rey 2001; Solano-Gallego et al. 2009).

Após inoculação na pele dos vertebrados, as leishmânias completam seu ciclo heteroxeno, garantindo a propagação da espécie para seres susceptíveis (Rey 2001).

1.2 Medidas de controle

De acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, a prevenção para esta doença deve ser dirigida à população humana, canina e ao vetor. O controle químico, a eutanásia canina e a educação em

saúde pública são as medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde Brasileiro (Brasil 2006). Os cães domésticos são considerados os maiores reservatórios urbanos, constituindo um importante fator de risco à população humana (Dantas-Torres et al. 2012; Moshfe et al. 2008).

O impacto do uso de coleiras impregnadas com deltametrina pode influenciar na mortalidade de cães, mas não na biologia dos flebótomos, podendo assim diminuir a taxa de transmissão da Leishmaniose Visceral Canina. Estas coleiras podem auxiliar no controle da Leishmaniose Canina e Humana, mas a sua eficácia pode ser diminuída nas áreas onde há uma presença significativa de animais silvestres, considerados reservatórios para esta enfermidade (Reithinger et al. 1999).

O tratamento de cães não é permitido no Brasil devido à inexistência de dados científicos que comprovem a diminuição da importância do cão como reservatório para Leishmaniose Visceral. O uso de drogas para Leishmaniose Visceral Humana em cães diminui os sinais clínicos, que podem desaparecer por completo, mas não previne recidiva. O uso indiscriminado destes medicamentos pode causar resistência do parasito às drogas atualmente disponíveis para tratamento dos seres humanos (Brasil 2010).

As medidas de controle que utilizaram somente a eliminação dos animais infectados mostraram resultados controversos, quando não associado ao controle simultâneo do vetor (Costa, Tapety & Werneck 2007).

1.3 Aspectos clínicos da leishmaniose canina

A Leishmaniose Visceral Canina é uma doença sistêmica que apresenta características clínicas variadas nos diversos órgãos afetados do hospedeiro devido aos seus mecanismos de imunopatogenicidade (Silva 2007; Solano-Gallego et al. 2009). Os sinais clínicos da doença nos cães têm sido amplamente descritos por diversos autores, entretanto são necessários mais estudos para estabelecer relações com a sintomatologia desenvolvida durante a doença (Amusatogui et al. 2003).

Os cães assintomáticos não apresentam nenhum sinal clínico aparente da leishmaniose e os sintomáticos podem apresentar um ou mais sintomas da doença (Costa-Val et al. 2007).

Os sinais clínicos mais comuns são perda de apetite, linfadenomegalia, febre, perda de peso, alopecia, ulceração na pele, hepatoesplenomegalia, onicogribose, conjuntivite, uveíte, hemorragia, diarreia, nevralgias, poliartrite e insuficiência renal (Dias et al. 2008; Queiroz et al. 2009). O aumento dos linfonodos é uma das primeiras manifestações clínicas a surgir, com maior envolvimento dos linfonodos poplíteo e pré-escapular (Baneth et al. 2008; Evans & Rebelo 1996).

As lesões dermatológicas são as manifestações mais frequentemente observadas. Pode ocorrer dermatite alopécica descamativa generalizada ou dermatite ulcerativa multifocal (Fondevila, Vilafranca & Ferrer 1997; Silva 2007; Torres-Neto et al. 2008). A dermatite alopécica descamativa está relacionada com a expressão do complexo de histocompatibilidade principal da classe II nas células de Langerhans e queratinócitos, associada a um infiltrado inflamatório de linfócitos T e a presença do parasito. Diferentemente da dermatite alopécica, a dermatite ulcerativa está associada à ausência de células apresentadoras de antígenos, número aumentado de macrófagos no local e presença do parasito (Fondevila, Vilafranca & Ferrer 1997).

É importante fazer o diagnóstico diferencial da Leishmaniose Visceral Canina em relação a outras doenças de pele, como as de origem hormonal, autoimune ou por outros parasitos.

As lesões oculares decorrem da deposição de imunocomplexos em tecidos, que podem resultar em uveíte, ceratoconjuntivite, blefarite e outras inflamações oculares (Baneth et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009).

A poliartrite pode ocorrer, podendo ser erosiva ou não, e causa alteração da marcha. A resposta do sistema imunitário provoca deposição de imunocomplexos na membrana sinovial, desencadeando um processo inflamatório. É possível visualizar microscopicamente a presença de parasitos no líquido sinovial (Collignon et al. 2009).

A insuficiência renal acontece em decorrência do acúmulo de imunocomplexos nos glomérulos e pode resultar em lesões como glomerulonefrite membranoproliferativa, nefrite intersticial, degeneração hialina, degeneração vacuolar, atrofia tubular e fibrose. Estas lesões também são encontradas em outras doenças (Costa et al. 2003).

1.4 Imunidade para *Leishmania. spp* no cão

Os cães podem apresentar-se sintomáticos ou assintomáticos. Em caninos sintomáticos os sinais clínicos são inespecíficos como febre irregular de longa duração, alterações cutâneas, lesões oculares, aumento de linfonodos, hepatoesplenomegalia, caquexia, anemia e outros sinais facilmente confundidos com os de outras doenças (Baneth et al. 2008). Caninos assintomáticos, geralmente, apresentam baixo parasitismo tecidual. Entretanto, no teste cutâneo e *in vitro* podem desenvolver uma resposta linfoproliferativa quando estimulados por antígenos de leishmânia, ambos associados à imunidade mediada por células. Nesses animais também foram observados aumento na produção de algumas citocinas como o interferon gama (INF- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), que podem estar relacionadas com a ausência de sinais clínicos (Reis et al. 2010).

A sintomatologia da LVC tem sido associada à ausência de resposta adequada dos linfócitos T, níveis elevados de anticorpo específico anti-*Leishmania* e alta carga parasitária em linfonodos, baço, fígado e medula óssea. Diferentes níveis de interação ocorrem nos tecidos infectados com *Leishmania spp.*, devido a ação de mecanismos efetores dos hospedeiros (Baneth et al. 2008; Pinelli et al. 1994; Reis et al. 2010). Os mecanismos responsáveis pela resistência ou susceptibilidade não estão totalmente esclarecidos. Fatores como idade, sexo, nutrição, susceptibilidade genética, co-infecções, secreção de citocinas, carga parasitária e virulência da cepa da *Leishmania* podem influenciar na polarização da resposta imunitária, favorecendo o aparecimento de sinais clínicos (Barbiéri 2006; Saridomichelakis 2009 e Solano-Gallego et al. 2009).

A variabilidade clínica e patológica da Leishmaniose Canina reflete o resultado de uma imunidade celular ineficiente que leva a inflamação e imunidade humoral hiperativa, que eventualmente, resulta na deposição de imunocomplexos em tecidos-alvo (Koutinas & Koutinas 2014). A história natural da doença está relacionada à resposta imunitária do hospedeiro, há uma interação diversificada e complexa entre os componentes dos sistemas imunitário inato e adaptativo.

O sistema imunitário inato possui um papel importante na proteção contra o parasito, além de ativar o sistema imunitário adaptativo, mesmo que

não atue de forma específica (Reis et al. 2010). Diversos componentes participam da imunidade inata, a leishmânia é reconhecida pelos fagócitos através dos PAMPs, há uma interação com os receptores expressos na superfície celular denominados receptores de reconhecimento de padrões moleculares de patógenos (PPRs). A partir dessa interação, fatores de transcrição serão ativados para que ocorra a síntese de citocinas e moléculas microbidas. Os macrófagos, neutrófilos e outras células fagocíticas que participam da resposta imunitária inata são capazes de produzir moléculas com ação microbicida, conhecidas como espécies reativas de oxigênio. Os fagócitos ativados em função da interação com o parasito passam a produzir óxido nítrico. NO é sintetizado por uma família de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintase (Rittig & Bogdan, 2000). O peróxido de hidrogênio também pertence ao grupo de espécies reativas de oxigênio que surgem através do metabolismo oxidativo (Wittmann et al, 2012).

O sistema complemento desempenha um papel importante na fagocitose, a interação do parasita com os receptores para complemento ocorre na presença do soro, pela ativação do componente C3 do complemento, que se liga na glicoproteína (gp63) para o receptor C3 e para o LPG do parasito as ligações ocorrem com o sítio específico para receptor C3 e receptor C1 (Handman & Bullen, 2002).

Os neutrófilos são as primeiras células que migram para o local da infecção, com a função primária de fagocitar os microorganismos. Uma vez ingeridas, as partículas estranhas sofrem ação microbicida e são destruídas por enzimas proteolíticas, armazenadas em grânulos e pela produção de espécies reativas de oxigênio (Awasthi, Mathur & Saha 2004; Ribeiro-Gomes & Sacks 2012). As opsoninas são os componentes do soro que atuam ligando-se à superfície dos microrganismos e a receptores específicos na superfície de fagócitos, este evento facilita a fagocitose. A fagocitose pode ser mediada pelo reconhecimento de padrões moleculares de patógenos (PAMPs) na superfície de microrganismos, via receptores para padrões moleculares de reconhecimento (Laskay, Zandbergen & Solbach 2003).

Com a fagocitose pelos neutrófilos inicia-se a resposta imunitária, este processo começa com a emissão de pseudópode que envolve a *Leishmania spp.* e após adesão por meio de receptores na superfície celular e do parasito

ocorre a interiorização do mesmo. No interior celular há formação do fagossoma que ao fundir com o lisossoma originam o fagolisossoma. O papel de neutrófilos no estabelecimento da infecção é conhecido, mas estudos referentes à função dos neutrófilos na leishmaniose visceral canina são escassos e contraditórios (Almeida et al. 2013). Em cães susceptíveis, a atividade fagocitária do neutrófilo é alta, mas sua capacidade de eliminar o parasito intracelular não é efetiva (Saridomichelakis 2009). O uso do teste do nitro blue tetrazolium (NBT) para avaliar a porcentagem de ativação de neutrófilos, em sangue canino, revelou que em animais controles e sintomáticos não houve redução do NBT, ao serem comparados com os cães que apresentaram linfadenopatia, como único sinal clínico (Gómez-Ochoa et al. 2010).

Após inoculação da forma promastigota na derme, a leishmânia evade à lise mediada pelo sistema do complemento e adere à superfície de macrófagos. Uma das funções destas células é transportar o agente para linfonodos regionais, em seguida, disseminando-se pelo organismo (Saridomichelakis 2009).

A resposta imune celular dependente de linfócitos é considerada o principal mecanismo efetor e se manifesta com uma aumentada proliferação celular no sangue periférico, acompanhada pela produção de IFN- γ e FNT- α , que ativam macrófagos, células responsáveis pela morte do parasito intracelular (Barbiéri 2006; Reis et al. 2010). Outro papel importante do macrófago é a erradicação intracelular de formas amastigotas, por produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Sua eliminação depende da produção de óxido nítrico (NO) induzida pela óxido nítrico sintase (iNOS), mas para a indução da resposta imune também é necessária a expressão da moléculas de superfície co-estimulatória B7 (Saridomichelakis 2009). Estudo realizado com macrófagos de cães infectados com *Leishmania (L.) infantum* mostrou maior produção de óxido nítrico na atividade anti-leishmânia. A adição de lipopolissacarídeo (LPS) não resultou em produção de NO, sugerindo que há outras vias para sua produção (Pinelli et al. 1994). Bradionísio et al (1996) observaram explosão respiratória reduzida em cães infectados e sugeriram que este fato poderia ser explicado, em parte, pela duração e a gravidade da doença nestes animais.

Houve evolução de sofisticados mecanismos na interação entre as leishmânias e seus hospedeiros, o que propiciou o desenvolvimento de mecanismos de escape à função de fagócitos, como a inibição de óxido nítrico e de citocinas que induzem ativação de macrófagos. Estas funções são necessárias para que ocorra o desenvolvimento de uma resposta imunitária eficaz (Olivier et al. 2005). O macrófago apresenta o antígeno via complexo de histocompatibilidade principal II aos receptores de linfócitos T. Simultaneamente, ocorre uma interação entre moléculas co-estimulatórias como a B7 em macrófagos, que desempenha papel importante na linfoproliferação (Saridomichelakis 2009). Foi observado que a presença de B7 está associada a ativação de células T e produção de IFN- γ . A diminuição da expressão desta molécula em cães sintomáticos sugere um possível mecanismo de escape pelas leishmânias (Pinelli et al. 1994).

A função de outros fagócitos como neutrófilos e eosinófilos ainda não foi totalmente esclarecida. Em cães susceptíveis, a atividade fagocitária do neutrófilo está elevada, mas não mostra relação com sua capacidade de eliminar o parasito intracelular (Saridomichelakis 2009).

A *Leishmania (L.) infantum* parece induzir uma resposta mista de células T auxiliar 1 (Ta1) e T auxiliar 2 (Ta2), onde o controle da replicação do parasito, a progressão da doença ou a cura são determinados pelo equilíbrio entre essas subpopulações de linfócitos T. As subpopulações de linfócitos Ta1 e Ta2 são importantes na resposta imunitária contra o parasito na Leishmaniose Visceral Canina. Com base no perfil de citocinas é possível observar a atuação destas duas subpopulações de linfócitos T (Boggiatto et al. 2010).

A imunidade protetora está relacionada com os linfócitos Ta1, e é mediada pelo IFN- γ , FNT- α e IL-2, que aumentam a atividade do macrófago. A IL-12 aumenta a produção de IFN- γ e é considerado um marcador ativo da doença (Barbiéri 2006; Saridomichelakis 2009). Cães assintomáticos apresentaram aumentada expressão de citocinas Ta1, como IFN- γ e FNT- α em lifonodos, enquanto que, os animais sintomáticos expressaram citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β . Os níveis de IL-4 e IL-12 foram semelhantes nos dois grupos. Entretanto, o papel das citocinas da resposta Ta2 ainda não

foi bem definida, sendo que a IL-4 tem sido associada à susceptibilidade à infecção pelo parasito (Saridomichelakis 2009).

Alguns estudos têm demonstrado que cães infectados apresentaram aumentada expressão de IL-10 em células do baço. A IL-10 é reguladora da atividade de linfócitos Ta1 no equilíbrio entre respostas Ta1 e Ta2 (Baneth et al. 2008).

Animais com Leishmaniose Visceral Canina apresentam uma forte resposta humoral, mais elevada em cães sintomáticos do que em cães assintomáticos, mas que parece não desempenhar função protetora (Baneth et al. 2008; Reis et al. 2010). Em cães susceptíveis ocorre ativação de células B com intensa produção de imunoglobulinas. Os anticorpos anti-leishmânia podem ser detectados antes do aparecimento da sintomatologia e estão relacionadas com a presença da doença e a gravidade dos sinais clínicos. O número de células B pode estar normal, aumentado ou diminuído no sangue periférico, pois há uma migração massiva destas células para órgãos linfóides (Saridomichelakis, 2009).

A IgG é a classe predominante entre as imunoglobulinas produzidas na LVC, a IgM, IgE e IgA aparecem com menor frequência e concentração. Níveis de IgG1 e IgG2 estão significativamente mais aumentados em animais sintomáticos do que em assintomáticos. Diversos estudos têm demonstrado que as subclasses de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 aparecem aumentadas e correlacionadas com a gravidade da doença (Saridomichelakis 2009).

Diferenças na resposta celular e humoral foram observadas entre os animais resistentes e susceptíveis a LVC, o que sugere que diferentes mecanismos regulatórios estão ocorrendo durante a infecção (Pinelli et al. 1994).

É importante uma melhor compreensão da interação parasito-hospedeiro, pois a partir dessas informações será possível estabelecer mecanismos que possam ajudar o desenvolvimento de vacinas e medicamentos.

JUSTIFICATIVA

O sistema imunitário inato faz parte da primeira linha de defesa contra a infecção pelas leishmânias e dependendo da resposta deste sistema, podem determinar a evolução da infecção pelo parasito para o desenvolvimento da leishmaniose doença ou para a cura.

Embora mais estudada em seres humanos, as funções da imunidade inata e particularmente a dos fagócitos ainda estão pouco esclarecidas em cães com leishmaniose. A compreensão da função fagocitária e da produção de moléculas microbidas reconhecidas como envolvidas na defesa contra as leishmânias, como a produção de radicais livres de oxigênio e nitrogênio, poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos efetivos de defesa desencadeados pelo hospedeiro contra as leishmânias e os mecanismos de escape do parasito, o que aumentará a compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos determinantes da doença nos cães e propiciar subsídios para melhor tomada de decisões em relação ao controle da doença.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imunitária inata dos fagócitos de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação com cães normais, pela avaliação da fagocitose e capacidade de produzir moléculas microbicidas.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos em cães naturalmente infectados pela *Leishmania spp.*

b) Avaliar a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos pelos receptores para opsoninas em cães naturalmente infectados pela *Leishmania spp.*

c) Avaliar a capacidade de produção de ânions superóxido pelos fagócitos do sangue periférico de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.*, pelo teste do *Nitro blue tetrazolium* (NBT).

d) Avaliar a capacidade de produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio pelos monócitos de sangue periférico de cães naturalmente infectados pela *Leishmania spp.*

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e delineamento experimental

Este estudo é do tipo experimental e comparou a função fagocitária e produção de radicais de oxigênio e nitrogênio por fagócitos de cães naturalmente infectados pela *Leishmania spp.* e cães normais.

Cães naturalmente infectados pela *Leishmania spp.* com sorologia positiva para leishmaniose foram avaliados clinicamente e sangue foi coletado para avaliação bioquímica, hemograma e avaliação das funções dos fagócitos. Foram avaliadas a capacidade fagocitária e a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico nos cães naturalmente infectados pela *Leishmania spp.* e nos controles normais. O fluxograma do presente trabalho encontra-se na figura 1.

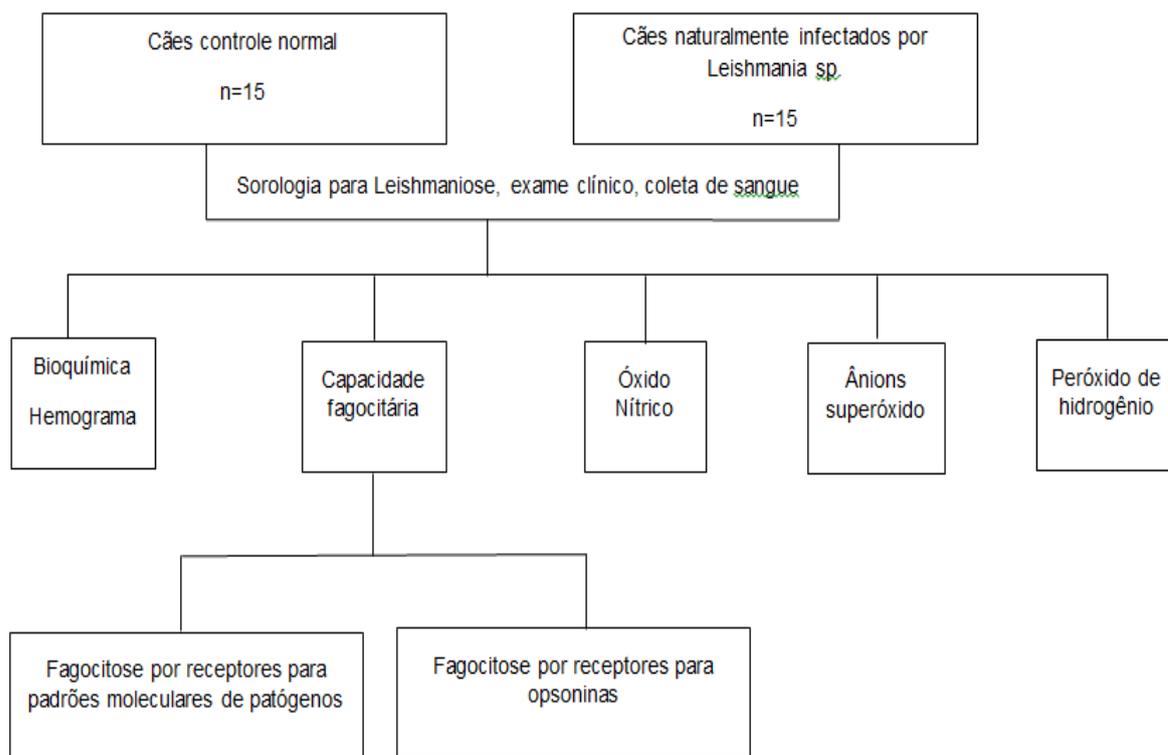


Figura 1. Fluxograma

4.2 Grupos de estudos

Foram utilizados 30 cães provenientes da DIVAL, sem raça definida, maiores que um ano de idade. Os cães foram distribuídos em dois grupos: 15 cães não infectados utilizados como controle normal, 15 cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.*. Foi utilizada uma amostra de conveniência e foram utilizados como critério de inclusão cães que apresentaram sorologia positiva para leishmaniose (DPP e/ou ELISA positivo), cães maiores que um ano de idade e ausência de outra doença possível de influenciar as funções do sistema imunitário, avaliadas pelos exame clínico e pesquisa de hematozoários. Foram critérios de exclusão: cães menores que um ano e cães que apresentaram sinais clínicos compatíveis com outras doenças e positividade na pesquisa de hematozoários.

Foram coletados 20 mL de sangue intracardíaco dos cães naturalmente infectados e 20 mL de sangue venoso dos cães controle normal para realização dos ensaios das funções do sistema imunitário inato *in vitro*, e determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos. A via intracardíaca foi escolhida devido ao estado físico debilitado em que a maioria dos animais com sorologia positiva para leishmaniose se encontravam, que dificultava realização da coleta de sangue venoso. Barboza-Marques (2003) não observou diferença entre o número total e percentual de leucócitos quando quantificado em sangue obtido por via venosa ou arterial, como também não observou diferença na aderência à lâmina e na função dos fagócitos quando comparados no sangue do mesmo indivíduo obtido por via venosa ou arterial.

Os animais foram examinados por um médico veterinário para excluir a presença de qualquer outra doença que pudesse interferir no presente estudo.

A coleta das amostras de sangue foi realizada na Diretoria de Vigilância Ambiental (DIVAL), tanto dos animais com leishmaniose como dos controles, e 10 mL dispensado em tubo com heparina foi encaminhada ao Laboratório de Imunologia Celular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para avaliação das funções dos fagócitos; 10 mL foi encaminhada ao Centro Integrado de Diagnóstico Veterinário (CID-vet) para realização do hemograma (5mL em tubo com EDTA) e a bioquímica sanguínea (5mL em tubo sem anticoagulante). Os testes foram realizados imediatamente após a coleta do sangue.

Os seguintes critérios foram utilizados para definição dos casos de Leishmaniose Canina: parâmetros clínicos sugestivos de leishmaniose, realização dos testes sorológicos *Dual Path Platform* (TR DPP®) (Bio-Manguinhos) e Ensaio Imunoenzimático (EIE) para leishmaniose visceral canina (Bio-Manguinhos) e o exame parasitológico direto de material obtido por punção de medula óssea, com coloração pelo método Panótico para comprovação da presença da leishmânia à pesquisa direta ao microscópio óptico.

Todos os animais do grupo leishmaniose tiveram diagnóstico sorológico, pelo exame parasitológico direto e clínico para leishmaniose. No grupo controle, a infecção pela leishmânia foi excluída por parâmetros clínicos e sorológicos.

Nos parâmetros clínicos os seguintes encontros foram considerados: aumento de linfonodos, perda de peso, letargia, onicogribose, lesões cutâneas (como dermatite esfoliativa com ou sem alopecia, dermatite ulcerativa), lesões oculares (como blefarite esfoliativa/ulcerativa, conjuntivite purulenta).

O teste rápido DPP utiliza uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para leishmânia. Em sequência, reage com antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* ligados a uma membrana (fase sólida). O conjugado se liga aos anticorpos específicos para leishmânia produzindo uma linha (roxa/rosa) na área do teste. Na ausência de anticorpos para leishmania a linha (roxa/rosa) não aparece na área do teste. Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área de controle e nenhuma na área de teste, o que indica ausência de anticorpos para leishmânia na amostra. Em um resultado reagente aparecerá duas linhas roxa/rosa, uma na área de controle e outra na área de teste, indicando que anticorpos para leishmânia foram detectados.

O ensaio imunoenzimático (EIE) para leishmaniose visceral canina consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura in vitro. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/ "strip" (fase sólida). A seguir, adicionam-se os soros controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídos. Caso as

amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida.

Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, antimunoglobina, marcado com enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB).

A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá aparecimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados são quantificados em um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450 nm.

As normas éticas para a pesquisa científica com animais foram rigorosamente obedecidas, conforme determina a lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008, os princípios éticos para experimentação animal, definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) e a Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO, 1978). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA), número de protocolo 134885/2013.

Coleta das amostras

A coleta de amostras de sangue e a punção da medula óssea foram realizadas por médicos veterinários. Foram utilizados focinheira e cambão para imobilização dos animais. Os animais foram contidos em decúbito lateral direito, segurando os membros anteriores e posteriores, impedindo apoio do animal para levantar. Para a coleta de sangue venoso, o garrote foi colocado próximo da articulação úmero-radial. Foi realizada assepsia com álcool 70% no local a ser puncionado. Utilizou-se uma seringa de 20 mL e a agulha foi introduzida sobre o vaso sanguíneo com o bisel voltado para cima, puxando o êmbolo da seringa lentamente, sem provocar vácuo, para evitar hemólise. Foram coletados 20 mL de sangue de cada animal. A agulha foi retirada da seringa e o sangue foi distribuído em 10 mL para o frasco com anticoagulante

heparina, 5 mL em um frasco com anticoagulante EDTA e 5 mL em um frasco sem anticoagulante. A punção cardíaca foi realizada após a anestesia, o animal foi colocado, em decúbito lateral direito e a agulha inserida em um ângulo de 10 a 30° acima do abdômen, lateralmente ao processo xifoide. Foram coletados 20 mL e distribuídos conforme descrito anteriormente para punção venosa. Para a punção de medula óssea dos animais com testes sorológicos positivos, após a contenção química do animal, foram realizadas a introdução da agulha (40X12mm) acoplada a uma seringa de 10 mL na crista ilíaca seguido do aspirado medular. Foram aspirados 1 mL e feitos 3 esfregaços a fresco, corados pelo método Panótico e analisados ao microscópio óptico para realização do exame parasitológico direto para identificação das leishmânias pelo aspecto morfológico.

Os animais infectados foram anestesiados com Midazolan (3mg/kg, IV), Propofol (20mg/kg, IV) e quetamina (10mg/kg, IV). Após a anestesia geral nos animais, foram coletados sangue intracardíaco e as medulas ósseas e em seguida os animais foram eutanasiados com uma dose intravenosa (IV) de cloreto de potássio (KCL).

Hemograma e bioquímica

Com as amostras de sangue coletadas no frasco com EDTA foram realizados: avaliação das características físicas do plasma, realizado um esfregaço sanguíneo para pesquisa direta de hematozoários por microscopia óptica, determinação do hemograma e bioquímica do sangue. O hematócrito foi determinado pela centrifugação do microcapilar, resultando em sedimentação das hemácias, e expresso em porcentagem. No hemograma, foram avaliados a hemoglobina, as hemácias, as plaquetas e os leucócitos, que foram determinados em um contador de células automático (BC-2800 vet, Mindray).

A coloração do esfregaço sanguíneo foi feita pelo Método Panótico Rápido.

A concentração de Proteína Plasmática Total (PPT) foi mensurada por refratometria do plasma obtido após centrifugação do microcapilar utilizado para realização do hematócrito.

Com as amostras de sangue sem anticoagulante foram realizados os exames bioquímicos creatinina, enzima hepática ALT, proteínas totais,

albumina e globulina. Os exames bioquímicos foram realizados pelo método cinético (BTS-350, Mindray).

Exame Parasitológico

Os exames parasitológicos para pesquisa direta das leishmânias foram feitos nos esfregaços de medula óssea e em “imprint” da lesão cutânea. As lâminas foram coradas pelo método Panótico.

Capacidade fagocitária em cães normais e cães naturalmente infectados

A avaliação da capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos foi realizada pelo teste de fagocitose em lâmina e em placa.

Preparo da suspensão estoque de leveduras

Foi utilizada a técnica descrita por Lachman e Hobart (1978) para o preparo de suspensão estoque de leveduras para a realização do teste de fagocitose. Quando as leveduras são preparadas por essa técnica há uma modificação em sua superfície que facilita a adsorção do componente C3 do complemento. Foi demonstrado por imunofluorescência que anticorpos presentes no soro também podem adsorver-se na superfície das leveduras (Muniz-Junqueira et al. 2003).

Para o preparo da levedura utilizou-se 50g de fermento fresco de pão (Fleischmann) dissolvidos em 220 mL de solução salina tamponada com fosfato pH 7,2, que foram autoclavados a 120°C, por trinta minutos e em seguida lavada com STF até a obtenção de sobrenadante límpido. O sedimento foi ressuspenso com 28 mL de STF contendo 0,1M de 2-mercaptoetanol e a suspensão foi incubada a 37°C por 2 horas em agitação.

Após este procedimento, a suspensão foi lavada três vezes por centrifugação para retirada do 2-mercaptoetanol e novamente suspensa em 55 mL de solução de 0,02M de iodoacetamida em STF, seguida de nova incubação por 2 horas à temperatura ambiente, com agitação. As leveduras foram lavadas três vezes por centrifugação em STF, suspensas em 220 ml de STF e o pH acertado para 7,2. Em seguida a preparação foi novamente autoclavada a 120°C, durante 30 minutos, e lavada com STF, por meio de

centrifugação até que o sobrenadante se apresentasse límpido, sendo então suspensa em 110 mL de tampão veronal pH 7,2, contendo azida sódica (200 mg/L), com o objetivo de preservá-las. Ao final deste processo de preparação das leveduras, elas foram mantidas a 4°C para serem utilizadas em cada experimento.

Preparo das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para utilização no teste da fagocitose e teste do NBT

Para cada experimento, foram retirados 50 µL da suspensão estoque, que foi lavada com STF, pH 7,2 três vezes por centrifugação por 5 min. As leveduras foram quantificadas em hematocítômetro, e em seguida suspensas em Hanks tris e incubadas com soro fetal bovino a 10% (previamente inativado a 56°C, por 30 minutos) em banho-Maria, a 37°C por 30 min. Para as leveduras sensibilizadas, substituiu-se o soro fetal bovino pelo soro fresco do próprio animal.

Separação das células

Os monócitos do sangue periférico foram obtidos por meio da técnica de separação de células mononucleares utilizando Percoll (GE Health Care Biosciences), densidade de 1,077.

Foram coletados 5 mL de sangue venoso em tubo vacutainer heparinizado. A amostra foi centrifugada a 200 g, por 10 minutos, a 4°C. O precipitado foi ressuspensão com STF, pH 7,2, gelada, utilizando o mesmo volume de soro retirado. Em seguida, foi colocado sobre o Percoll, densidade 1077; sendo utilizados 3 mL de Percoll para cada 5 mL de sangue. A amostra foi centrifugada a 750 g por 15 minutos a 4°C. A camada de células mononucleares foi recuperada e transferida para outro tubo, onde foi ressuspensa em 10 mL de STF, pH 7,2, gelada e centrifugada a 400 g, por 10 minutos, a 4°C para retirar o Percoll. O sobrenadante foi desprezado e as células foram novamente resussuspensas em 10 mL de STF gelada e centrifugadas a 200g, por 10 minutos, a 4°C para retirar as plaquetas. O sobrenadante foi desprezado mais uma vez e as células ressuspensas em 2 mL de RPMI incompleto estéril, pH 7.2, com Hepes 20mM, glutamina 2mM e 2.5 mg/dL de gentamicina e mantidas a 4°C até o término da contagem.

A viabilidade das células recuperadas foi avaliada em hematocítômetro pela exclusão da nigrosina.

Teste da fagocitose em lâmina

O teste de fagocitose foi realizado por técnica adaptada de Muniz-Junqueira et al. 2001. A capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos de cães com leishmaniose e controles foi analisada pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, para o qual foram utilizadas leveduras não sensibilizadas e pelos receptores para complemento e fração Fc da imunoglobulina, quando foram utilizadas as leveduras sensibilizadas. Para sensibilizar as leveduras foi utilizado o soro do próprio animal que foi incubado, previamente, com leveduras por 30 minutos em banho-Maria, a 37°C.

Para avaliar a capacidade fagocitária dos neutrófilos e monócitos foram estudados 15 cães com infecção natural pela leishmânia e 15 cães controle normal. Para realização do teste de fagocitose em lâmina foram distribuídos 40µL sangue heparinizado por escavação, para cada cão individualmente, nas áreas delimitadas da lâmina de microscopia, em lâminas previamente marcadas. Em seguida, incubadas em estufa a 37°C por 45 minutos. Após esse período, as lâminas foram retiradas da estufa e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (STF) a 37°C, para retirar hemácias e células não aderentes. Em seguida, foram distribuídos 20µL de suspensão das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, nas proporções 5 ou 20 leveduras, sensibilizadas ou não, por fagócito. As preparações foram então incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (STF) a 37°C, para retirar as leveduras não aderidas/ingeridas. A última lavagem de todas as preparações foi realizada com Hanks-triz contendo 30% de soro fetal bovino. O excesso foi desprezado e as preparações foram secas com vento quente. As lâminas foram fixadas com metanol por 1 min e coradas com Giemsa 10% por 10 min, em seguida lavadas com água. Os fagócitos foram analisados em microscópio óptico com objetiva de imersão (aumento de 1000X) e contados 200 monócitos e 200 neutrófilos por escavação para a determinação do índice fagocitário.

Para a determinação do índice fagocitário de neutrófilos e monócitos multiplicou-se a média do número das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

ingeridas por fagócito pela proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose. Assim, o Índice Fagocitário = média de leveduras ingeridas por fagócito x proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose (Muniz-Junqueira et al. 2003).

Fagocitose em placa

Apenas em um subgrupo de 19 animais (12 controles e 7 com leishmaniose) a fagocitose em placa foi realizada. Após a separação das células mononucleares pela centrifugação em Percoll, conforme descrita anteriormente, foram distribuídas 5×10^5 células por poço, em 500 μ L, em RPMI incompleto, estéril, pH 7.2, com HEPES 20mM, glutamina 2mM e 2.5 mg/dL de gentamicina, em placas estéreis de 24 poços. As células foram incubadas por 2 horas, a 37°C, em estufa a 5% de CO₂, para permitir a aderência dos monócitos na lamínula. Logo após a incubação os poços foram lavados duas vezes com STF aquecida a 37°C, pH 7,2 e distribuídos 450 μ L de RPMI completo estéril, pH 7.2, com HEPES 20mM, glutamina 2mM e 2.5 mg/dL de gentamicina com soro fetal bovino a 10% em cada escavação. Adicionou-se as leveduras na proporção de 5 ou 10 leveduras por monócito, em um volume de 50 μ L de suspensão em cada poço e as placas foram incubadas por 30 minutos para permitir a fagocitose. Em seguida, todos os poços foram lavados com STF pH 7,2 a 37°C, por 3 vezes cada um. Acrescentou-se RPMI completo estéril, pH 7.2, com HEPES 20mM, glutamina 2mM e 2.5 mg/dL de gentamicina acrescido de 30% SFB para melhor preservação das células. Em seguida as placas foram secas com vento quente, as células foram fixadas com metanol por 1 min e coradas com Giemsa 10%, por 10 min. As lamínulas foram retiradas das placas e fixadas com meio para montagem (entelan) sobre uma lâmina de microscopia e analisadas ao microscópio óptico para determinação do índice fagocitário.

Teste do NBT

A avaliação da produção de ânions superóxido pelos neutrófilos de sangue periférico dos animais foi realizada pela técnica da redução do corante Nitroblue tetrazolium (NBT).

Foram distribuídos 40 μ L de sangue heparinizado dos cães nas áreas delimitadas da lâmina de microscopia, em seguida, incubadas em estufa a

37°C por 45 min. Após esse período, as lâminas foram retiradas da estufa e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (STF), a 37°C, para retirar hemácias e células não aderentes. As células foram tratadas com 20µL de solução de NBT (0,25mg/0,5mL de Hanks), e estimuladas ou não com 10 leveduras sensibilizadas por fagócito. Em seguida, as preparações foram incubadas em estufa a 37°C por 30 min, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (STF) a 37°C, para retirar as leveduras não aderidas/ingeridas. A última lavagem foi realizada com Hanks-triz com 30% de soro fetal bovino e seca com vento quente. As lâminas foram fixadas com metanol por 1 minuto e contra-coradas com safranina por 5 min. As células foram examinadas ao microscópio óptico contando 200 fagócitos por preparação, e expressas como a porcentagem de células que reduziram o corante NBT.

Avaliação da produção de óxido nítrico pelos monócitos de sangue periférico

A produção do óxido nítrico foi avaliada pela quantificação do nitrito dos sobrenadantes das culturas de células mononucleares. A determinação do óxido nítrico foi realizada pela reação de Griess, descrita por Green et al. 1981.

Após a separação das células mononucleares por centrifugação em Percoll, como descrito anteriormente, foram distribuídas, em triplicata, 2×10^5 células mononucleares por poço, em um volume de 200µL de RPMI incompleto, estéril, pH 7.2, com Hapes 20mM, glutamina 2mM e 2.5 mg/dL de gentamicina, em placa estéril de 96 escavações, de fundo chato. As células foram incubadas por 2 horas, a 37°C em estufa a 5% de CO₂ em ar para permitir aderência dos fagócitos. Logo após a incubação todas as escavações foram lavadas duas vezes com 350µL STF pH 7.2 a 37°C. Em seguida foram acrescentados 200µL RPMI completo, estéril, pH 7.2, com Hapes 20mM, glutamina 2mM e 2.5 mg/dL de gentamicina com soro fetal bovino a 10%.

Para determinação da melhor dose do LPS para estimular os fagócitos a produzirem o óxido nítrico, foram utilizados LPS nas seguintes concentrações: 10ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 500ng/mL, 1µg/mL, 5 µg/mL de LPS.

As células mononucleares foram incubadas por mais 24 horas, a 37°C em estufa em 5% de CO₂.

Depois das 24 horas de incubação, as placas de 96 escavações foram centrifugadas por 10 min, em temperatura ambiente. Foram então transferidos 100µL do sobrenadante para outra placa estéril, de fundo chato, onde em seguida foi acrescentado 100µL do reagente de Griess (1-N naftiletileno diamina dihidroclorido a 0,1 %, sulfanilamida a 1% e H₃PO₄ a 25%). Após dez minutos foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro (Spectramax® Plus 384, Molecular Devices) com filtro de 540nm.

A curva padrão, utilizando nitrito de sódio, foi elaborada pela diluição seriada de uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) 200µM, preparada a partir de uma solução de NaNO₂ 1M.

Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de sangue periférico

A produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de sangue periférico de cães foi determinada pela técnica de Pick e Mizel (1981). Esta técnica consiste na oxidação do vermelho de fenol pela peroxidase na presença de H₂O₂, resultando em um produto que pode ser lido por colorimetria.

Após a separação das células mononucleares por Percoll, conforme descrito anteriormente, foram distribuídas, em triplicata, 2x10⁵ células por poço, em um volume de 200µL de RPMI incompleto, estéril, pH 7.2, com Hepes 20mM, glutamina 2mM e 2.5 mg/dL de gentamicina, em placa de 96 poços, estéril, de fundo chato. As células foram incubadas por 2 h a 37°C em estufa a 5% de CO₂ para aderência dos fagócitos. Logo após a incubação todos os poços foram lavados duas vezes com 350µL STF pH 7.2 a 37°C.

Os poços destinados para as preparações basais foram preenchidos em triplicata com 140µL de solução de vermelho fenol e nos poços destinados para as preparações estimuladas, foi acrescentado o PMA (19 unidades/mL) nas seguintes concentrações 20nM, 40nM, 80nM, 100nM, 200nM. As células mononucleares foram incubadas por mais 60 minutos, a 37°C em estufa a 5% de CO₂.

Foi preparada uma curva padrão com as concentrações supracitadas. Utilizou-se diluição seriada a partir de uma solução estoque de H₂O₂ na concentração de 10mM, 95 µl de H₂O₂ (30 volumes) e 100mL água milli-Q.

Após a retirada da placa da incubação, a reação foi interrompida colocando 10µL de NaOH 1N em cada escavação. A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro (Spectramax® Plus 384, Molecular Devices) com filtro de 620nm.

Padronização do número de células aderidas nas lâminas e lamínulas

Para determinar o número de células de cães que aderem à lâmina, foram calculados o número de células aderidas às escavações de 7mm sobre lâminas e de lamínulas de 13mm, após permitir a aderência, conforme previamente descrito, por 45 min para as escavações de 7mm e por 2 h para as lamínulas de 13mm, pela quantificação de 10% da área da escavação para as lâminas de 7mm e para as lamínulas de 13mm.

Determinou-se no número de campos em que as células deveriam ser quantificadas pela divisão da área da escavação na lâmina (7mm) ou lamínula (13 mm) pela área da objetiva do microscópio. Foram contados neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos em 10% da área. Ficaram aderidos nas lâminas de 7mm 16.620 monócitos e 12.540 neutrófilos após 45 min de incubação. E nas lamínulas de 13mm, ficaram aderidos 11.130 monócitos e 18.230 neutrófilos após 2h de incubação

4.3 Análise estatística

A verificação da normalidade ou não das amostras foi feita pelo teste de Kolmogorov–Smirnov e a igualdade das variâncias determinada pelo teste de Bartlett.

Para a comparação entre duas variáveis independentes com distribuição normal foi utilizado o teste *t* de Student e para as que não mostraram distribuição normal foi utilizado o teste Mann-Whitney. Para a comparação entre mais do que duas variáveis, após a determinação da normalidade ou não da amostra, foram utilizados os testes de ANOVA, seguido do teste de Student-Newman Keuls para comparação entre os grupos com distribuição normal e o

teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos com distribuição não normal.

As diferenças entre as variáveis foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devido ao acaso (erro tipo I) foi menor do que 5% ($p < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software Prism® for Windows (GraphPad Software, Inc., USA, 2005).

RESULTADOS

5.1 Parâmetros clínicos e laboratoriais dos cães estudados.

Foram estudados 22 cães machos e 8 cães fêmeas, e os seguintes sinais clínicos característicos da doença foram observados: alopecia, descamação (figura 3), úlcera na pele (figura 2), onicogribose (figura 4), lesões oculares (figura 5 e 6), caquexia, linfadenomegalia, ceratoconjuntivite. A presença de sinais clínicos foi expressa em porcentagem (tabela 1).



Figura 2 – Úlcera na pele, localizada no membro posterior em animal com leishmaniose.



Figura 3 – Lesão descamativa em animal com leishmaniose.



Figura 4 - Onicogribose em animal com leishmaniose.



Figura 5 - Lesões oculares e tegumentares em animal com leishmaniose.



Figura 6 - Lesões perioculares em animal com leishmaniose.

Tabela 1 - Parâmetros clínicos apresentados por 15 cães com leishmaniose

Sinais clínicos	Número	Porcentagem
Alopecia	5	33%
Descamação	7	46%
Úlcera na pele	3	20%
Onicogribose	4	26%
Caquexia	7	46%
Linfoadenomegalia	6	40%
Ceratoconjuntivite	8	53%

5.1.2 Bioquímica do sangue nos animais com leishmaniose e controles normais.

Foram analisados parâmetros bioquímicos de cães com leishmaniose (n = 11) e controles normais (n=11). (Tabela 2).

Os cães com leishmaniose apresentaram diminuição da atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) em relação a cães normais, sendo que a mediana da atividade sérica da ALT foi 25,8 U/l em cães com leishmaniose, enquanto a de cães normais foi 43,2 U/l ($p=0.0020$, teste t , com correção de Welch). Não foram observadas diferenças na concentração sérica da creatinina entre os animais com leishmaniose e controles normais ($p=0.35$, teste t , com correção de Welch).

As proteínas totais (PT) mostraram-se aumentadas em cães com leishmaniose em relação a cães normais, sendo a mediana para os cães com leishmaniose de 7,5 g/dL e a dos cães controle normal de 5,6 g/dL ($p=0.0008$, teste t , com correção de Welch). Não houve diferença na concentração sérica de albumina entre cães com leishmaniose e cães normais ($p=0,93$, teste t). Entretanto, a concentração sérica de globulina mostrou-se mais elevada em

cães com leishmaniose (5,4 g/dL) do que em cães normais (3,0 g/dL) ($p < 0.0001$, teste t). Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros da bioquímica do sangue de cães com leishmaniose (n=11) e controles normais (n=11).

Características	Controles normais (n=11)		Leishmaniose (n=11)		teste p
	Média ±DP		Média ±DP		
Proteínas totais	Média ±DP	5,83±0,72	Média ±DP	7,90±1,45	teste t com correção de Welch p < 0,0008
	Mediana Qi e Qs	5,6 5,0 e 6,6	Mediana Qi e Qs	7,5 7,0 e 8,9	
Albumina	Média ±DP	2,49±0,33	Média ±DP	2,50±0,60	teste t p < 0,93
	Mediana Qi e Qs	2,5 2,2 e 2,8	Mediana Qi e Qs	2,3 2,0 e 3,0	
Globulina	Média ±DP	3,30±0,84	Média ±DP	5,43±0,93	teste t p < 0,0001
	Mediana Qi e Qs	3,0 2,5 e 4,0	Mediana Qi e Qs	5,4 5,0 e 5,9	
Creatinina	Média ±DP	1,01±0,31	Média ±DP	0,91±0,14	teste t com correção de Welch p < 0,35
	Mediana Qi e Qs	1,0 0,8 e 1,2	Mediana Qi e Qs	0,9 0,8 e 1,0	
Alanina aminotransferase	Média ±DP	53,76±21,69	Média ±DP	26,24±3,96	teste t com correção de Welch p < 0,0020
	Mediana Qi e Qs	43,2 40,20 e 80,0	Mediana Qi e Qs	25,8 23,4 e 28,8	

Qi= quartil inferior 25; Qs= quartil superior 75

5.1.3 Hemograma dos animais com leishmaniose e controles normais.

A avaliação dos parâmetros hematológicos mostrou anemia e plaquetopenia nos cães com leishmaniose. Houve menor número de hemácias em cães com leishmaniose em relação aos cães normais, sendo a mediana para os cães com leishmaniose de $4.900 \times 10^6 / \text{mm}^3$ que foi menor do que em cães normais ($7.000 \times 10^6 / \text{mm}^3$) ($p < 0.0001$, teste t). O hematócrito foi menor em cães com leishmaniose (30%) em relação aos cães normais (47%) ($p < 0.0001$, teste t). Observamos também menor concentração de hemoglobina em cães com leishmaniose (9,1 g/dL) em relação aos cães normais (16,0 g/dL) ($p < 0.0001$, teste t). Entretanto, não foram observadas diferenças entre VCM ($p = 0,18$; teste de Mann-Whitney), HCM ($p = 0,09$, teste de Mann-Whitney) e CHCM ($p = 0,20$, teste de Mann-Whitney) de cães com leishmaniose em relação aos cães normais. As plaquetas estavam menores em cães com leishmaniose em relação aos cães normais, sendo a mediana em cães com leishmaniose de

283.000 mm³ e a de cães normais 371.000 mm³ (p=0,0086, teste de Mann-Whitney) (Tabela 3).

A análise da série branca mostrou leucopenia com neutrofilia relativa e desvio à esquerda. Os leucócitos totais mostraram-se diminuídos nos cães com leishmaniose em relação aos cães normais. Foi observado que a mediana do número total de leucócitos dos cães com leishmaniose (7500 mm³) foi menor do que o de cães normais (15200 mm³) (p=0,0053, teste *t*). A mediana das formas em bastonetes dos neutrófilos apresentou-se maior em cães (8,0%) com leishmaniose do que em cães normais (2,0%) (p=0,0002, teste de Mann-Whitney), sendo que os animais com leishmaniose apresentaram 73% de neutrófilos segmentados contra 59% dos animais controles (p=0,06, teste *t*).

Observamos que a mediana da porcentagem de eosinófilos de cães com leishmaniose (2,0%) foi menor do que em cães normais (11,0%) (p=0,0163, teste de Mann-Whitney). A mediana da porcentagem dos linfócitos em cães com leishmaniose (6%) foi menor do que em cães normais (14%) (p=0,0406, teste *t* com correção de Welch). Entretanto, não houve diferença na mediana da porcentagem de monócitos entre cães com leishmaniose e normais (p=0,64, teste *t*).

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos (série vermelha) de cães com leishmaniose (n=11) e controles normais (n=11).

Exame	Controles normais (n=11)		Leishmaniose (n=11)		teste p
	Média ±DP		Média ±DP		
Hemácias / mm ³	Média ±DP	7,17±0,94	Média ±DP	4,90±1,10	teste t p < 0.0001
	Mediana	7,0	Mediana	4,9	
	Qi e Qs	6,3 e 8,1	Qi e Qs	4,1 e 5,2	
Hemoglobina / g/dL	Média ±DP	15,95 ± 2,49	Média ±DP	10,23 ± 2,82	teste t p < 0.0001
	Mediana	16,0	Mediana	9,1	
	Qi e Qs	14,3 e 18,0	Qi e Qs	8,3 e 11,3	
Hematócrito	Média ±DP	47,55±7,43	Média ±DP	31,27±7,56	teste t p < 0.0001
	Mediana	47,0	Mediana	30,0	
	Qi e Qs	43,0 e 54,0	Qi e Qs	26,0 e 34,0	
VCM fL	Média ±DP	66,06±2,59	Média ±DP	65,16±1,89	Mann-Whitney p= 0,18
	Mediana	67,	Mediana	65,3	
	Qi e Qs	64,2 e 67,6	Qi e Qs	63,4 e 66,2	
HCM pg	Média ±DP	22,14±0,88	Média ±DP	21,73±0,79	Mann-Whitney p= 0,09
	Mediana	22,4	Mediana	21,9	
	Qi e Qs	21,7 e 22,6	Qi e Qs	21,0 e 22,40	
CHCM %	Média ±DP	33,54±0,68	Média ±DP	33,35±0,45	Mann-Whitney p= 0,20
	Mediana	33,4	Mediana	33,2	
	Qi e Qs	33,2 e 33,4	Qi e Qs	33,1 e 33,3	
Plaquetas mm ³	Média ±DP	398,9±127,6	Média ±DP	239,5±126,6	Mann-Whitney p= 0,0086
	Mediana	371,0	Mediana	283,0	
	Qi e Qs	336,0 e 467,0	Qi e Qs	123,0 e 322,0	

VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média;
Qi= quartil inferior 25; Qs= quartil superior 75

Tabela 4 - Parâmetros hematológicos (série branca) de cães com leishmaniose (n=11) e controles normais. (n=11).

Exame	Controles normais (n=11)		Leishmaniose (n=11)		teste p
	Média ±DP		Média ±DP		
Leucócitos totais/mm ³	Média ±DP	14,75±4,35	Média ±DP	8,5±4,98	teste t p= 0,0053
	Mediana	15,25	Mediana	7,5	
	Qi e Qs	12,0 e 15,9	Qi e Qs	5,5 e 9,7	
Neutrófilo bastonete	Média ±DP	2,0±0,90	Média ±DP	8,0±3,11	Mann-Whitney p= 0,0002
	Mediana	2,0	Mediana	8,0	
	Qi e Qs	1,0 e 2,0	Qi e Qs	6,0 e 11,0	
Neutrófilo segmentado	Média ±DP	60,82±13,16	Média ±DP	71,64±13,20	teste t p= 0,06
	Mediana	59,0	Mediana	73,0	
	Qi e Qs	56,0 e 65,0	Qi e Qs	69,0 e 80,0	
Eosinófilo	Média ±DP	10,0±5,81	Média ±DP	3,81±6,25	Mann-Whitney p= 0,0163
	Mediana	11,0	Mediana	2,0	
	Qi e Qs	5,00 e 13,0	Qi e Qs	1,0 e 4,0	
Linfócito	Média ±DP	15,55±12,01	Média ±DP	6,54±5,29	teste t com correção de Welch p= 0,0406
	Mediana	14,0	Mediana	6,0	
	Qi e Qs	7,0 e 22,0	Qi e Qs	3,0 e 9,0	
Monócito	Média ±DP	11,82±3,12	Média ±DP	11,0±4,9	teste t p= 0,64
	Mediana	12,0	Mediana	12,0	
	Qi e Qs	9,0 e 13,0	Qi e Qs	8,0 e 15,0	

Qi= quartil inferior 25; Qs= quartil superior 75

5.2 Avaliação da função fagocitária

5.2.1 Fagocitose por neutrófilos

Para analisar a influência da infecção por *Leishmania spp.* sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos foram utilizados o índice fagocitário dos neutrófilos, a proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose e a média de partículas fagocitadas por neutrófilo, em cães naturalmente infectados em comparação a cães não infectados.

5.2.1a Por receptores para padrões moleculares de patógenos

Cães com leishmaniose apresentaram menor capacidade fagocitária pelos neutrófilos do que cães normais quando avaliados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. Observamos que a mediana do índice fagocitário dos neutrófilos foi menor nos cães com leishmaniose (1,0) do que nos cães controle normal (6,5), quando testamos a fagocitose pelos padrões moleculares de patógenos, utilizando a proporção de 20 leveduras por neutrófilo ($p=0,016$, Teste Mann-Whitney). Esta deficiência foi devida à menor proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, sendo a mediana de 1,0 para cães com leishmaniose e de 4,0 para cães controles normais ($p=0,0037$, Teste Mann-Whitney). Pois não houve diferença estatística no número de leveduras ingeridas por neutrófilo entre cães com leishmaniose (1,0) e cães normais (1,33) ($p=0,27$, Teste Mann-Whitney) (Figura 7).

Esta diferença não foi evidenciada quando a fagocitose foi analisada na proporção de 5 leveduras não sensibilizadas por neutrófilo ($p>0,05$) (Figura 8)



Figura 7 - Capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos em cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação com controles normais, utilizando 20 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) não sensibilizadas por neutrófilo. (A) Número de leveduras ingeridas por neutrófilo ($p=0,27$, Teste Mann-Whitney). (B) Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose ($p=0,0037$, Teste Mann-Whitney). (C) Índice fagocitário dos neutrófilos ($p=0,016$, Teste Mann-Whitney).

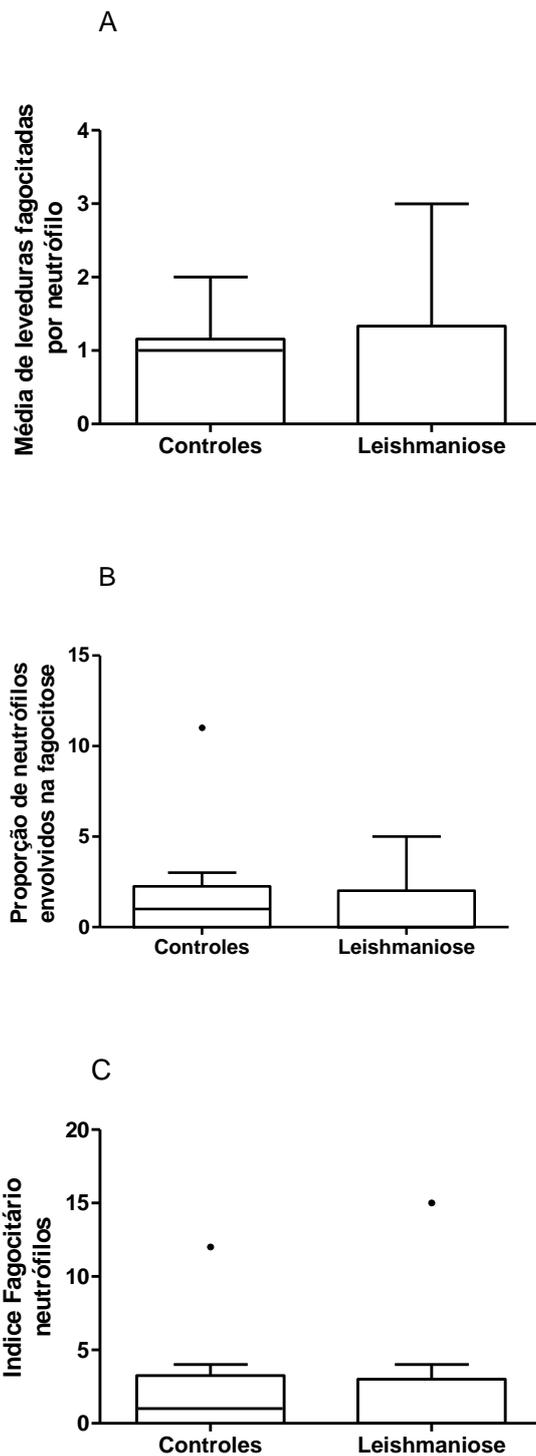


Figura 8 - Capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos em cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação com controles normais, utilizando 5 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) não sensibilizadas por neutrófilo. (A) Número de leveduras ingeridas por neutrófilo ($p=0,49$, Teste Mann-Whitney). (B) Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose ($p=0,53$, Teste Mann-Whitney). (C) Índice fagocitário dos neutrófilos ($p=0,65$, Teste Mann-Whitney).

5.2.1b Por receptores para opsoninas

Quando analisamos a fagocitose facilitada por opsoninas observamos que número de leveduras ingeridas por neutrófilo foi maior em cães com leishmaniose (1,87) em relação aos controles normais (1,44) ($p=0.0020$, teste t , seguido pela correção de Welch), quando utilizamos a proporção de 5 leveduras por neutrófilo. Entretanto, não houve diferença estatística na proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose, sendo a mediana de 79,0 para cães com leishmaniose e de 66,5 para cães controles normais ($p=0,16$, Teste t , seguido da correção de Welch). Também não houve diferença estatística entre a mediana do índice fagocitário dos neutrófilos dos cães com leishmaniose (129,5) em relação aos cães não infectados (92,0) ($p=0,89$, teste t). (Figura 9).

Nenhuma diferença foi evidenciada quando a fagocitose pelos receptores para opsoninas foi analisada na proporção de 20 leveduras não sensibilizadas por neutrófilo ($p>0,05$). (Figura 10).

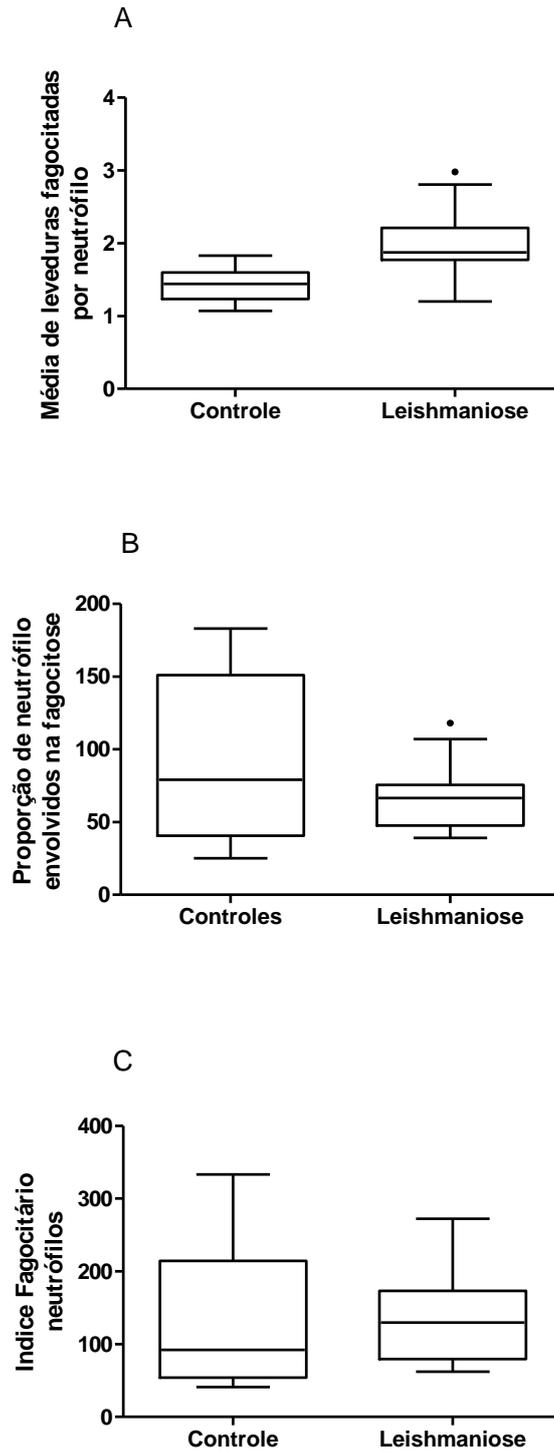


Figura 9 - Capacidade fagocitária de neutrófilos de cães naturalmente infectados pela *Leishmania spp.*, pelos receptores para complemento e fração Fc da imunoglobulina, utilizando 5 *Saccharomyces cerevisiae* por neutrófilo, comparada com a de cães não infectados. (A) Número de leveduras ingeridas por neutrófilo ($p=0,0020$, teste t com correção de Welch). (B) Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose ($p=0,16$, teste t com correção de Welch). (C) Índice fagocitário dos neutrófilos ($p=0,89$, teste t).



Figura 10 - Capacidade fagocitária de neutrófilos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas, utilizando 20 *Saccharomyces cerevisiae* por neutrófilo, comparada com a de cães controle normal. (A) Número de leveduras ingeridas por neutrófilo ($p=0,0028$, Teste Mann-Whitney). (B) Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose ($p=0,0568$, teste t). (B) (C) Índice fagocitário dos neutrófilos ($p=0,12$, teste t).

5.2.2 Fagocitose por monócitos

5.2.2 a. Por receptores para padrões moleculares de patógenos

Não houve diferença entre a capacidade fagocitária pelos monócitos de cães com leishmaniose e cães controle normal ($p>0,05$) quando avaliados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, nas proporções de 5 ou 20 leveduras não sensibilizadas por monócito. (Figuras 11 e 12).

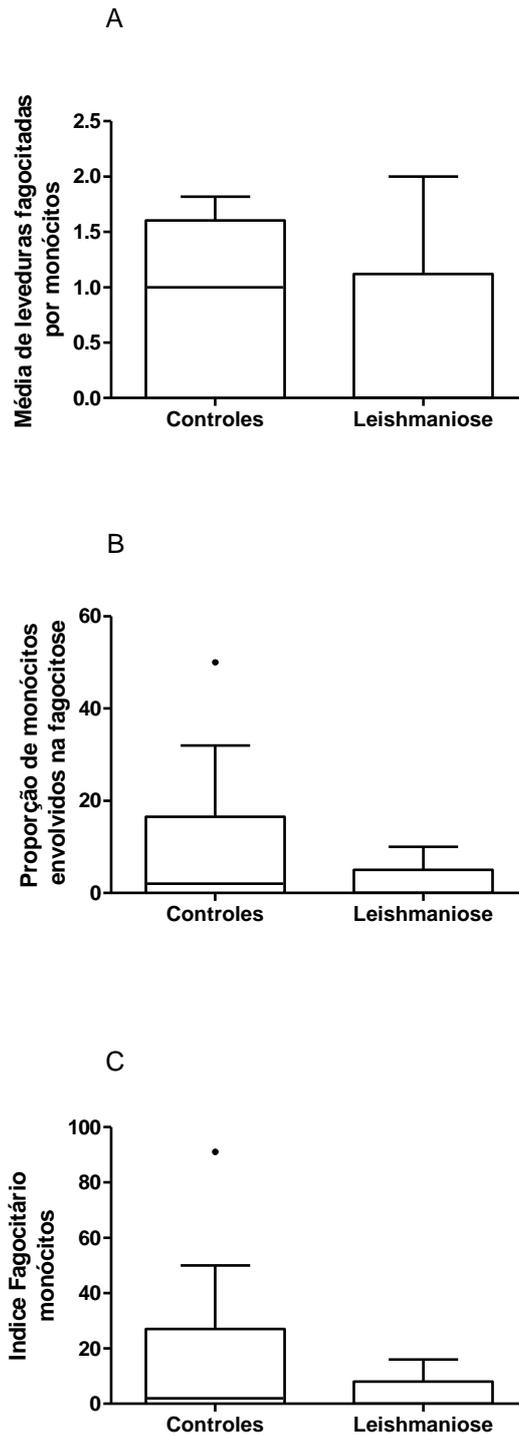


Figura 11 - Capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos utilizando 5 *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por monócito, em cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação com a de cães controle normal. (A) Número de leveduras ingeridas por monócito ($p=0,36$, Teste Mann-Whitney). (B) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,46$, Teste Mann-Whitney). (C) Índice fagocitário dos monócitos dos cães ($p=0,40$, Teste Mann-Whitney).

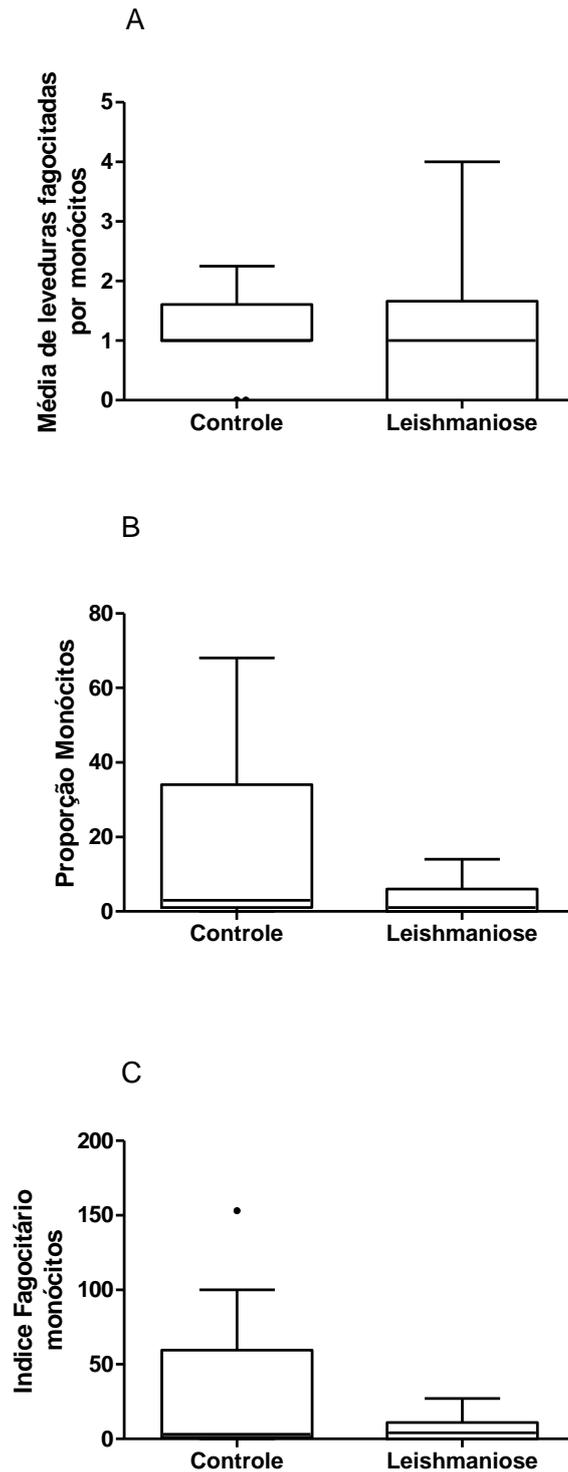


Figura 12 - Capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, utilizando 20 *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por monócito, em cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação a de cães controle normal. (A) Número de leveduras ingeridas por monócito ($p=0,85$, Teste Mann-Whitney). (B) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,30$, Teste Mann-Whitney). (C) Índice fagocitário dos monócitos ($p=0,45$, Teste Mann-Whitney).

5.2.2 b. Por receptores para opsoninas

Monócitos de cães com leishmaniose apresentaram maior capacidade fagocitária em comparação aos de cães normais, quando avaliados pelos receptores para opsoninas, tanto na proporção de 5 quanto na proporção de 20 leveduras sensibilizadas por monócito.

Na proporção de 5 leveduras sensibilizadas por monócito, a mediana do índice fagocitário dos monócitos dos cães com leishmaniose (135,0) foi 4,2 vezes maior do que a dos cães controle normal (32,0) ($p=0,0028$, Teste Mann-Whitney). O aumento do IF deveu-se tanto ao aumento da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose quanto ao maior número de leveduras ingeridas por monócito. Observamos que a mediana da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose foi aproximadamente o dobro nos cães com leishmaniose (62,50) do que a dos cães controle normal (29,00) ($p=0,0368$, teste t); e que o número de leveduras ingeridas por monócito foi maior em cães com leishmaniose (2,0) quando comparados aos cães controle normal (1,0) ($p=0,0005$, Teste Mann-Whitney). (Figura 13).

Na proporção de 20 leveduras sensibilizadas por monócito, a mediana do índice fagocitário dos monócitos foi maior nos cães com leishmaniose (280,5) do que em cães controle normal (52,00) ($p=0,0008$, teste t). Isto se deveu a maior ingestão de leveduras por monócito nos cães com leishmaniose (2,4) quando comparados aos cães controle normal (1,0) ($p=0,0002$, Teste Mann-Whitney), pois não houve diferença entre as medianas da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose em cães com leishmaniose (119,0) comparada aos cães controle normal (70,50) ($p=0,10$, Teste Mann-Whitney). (Figura 14).

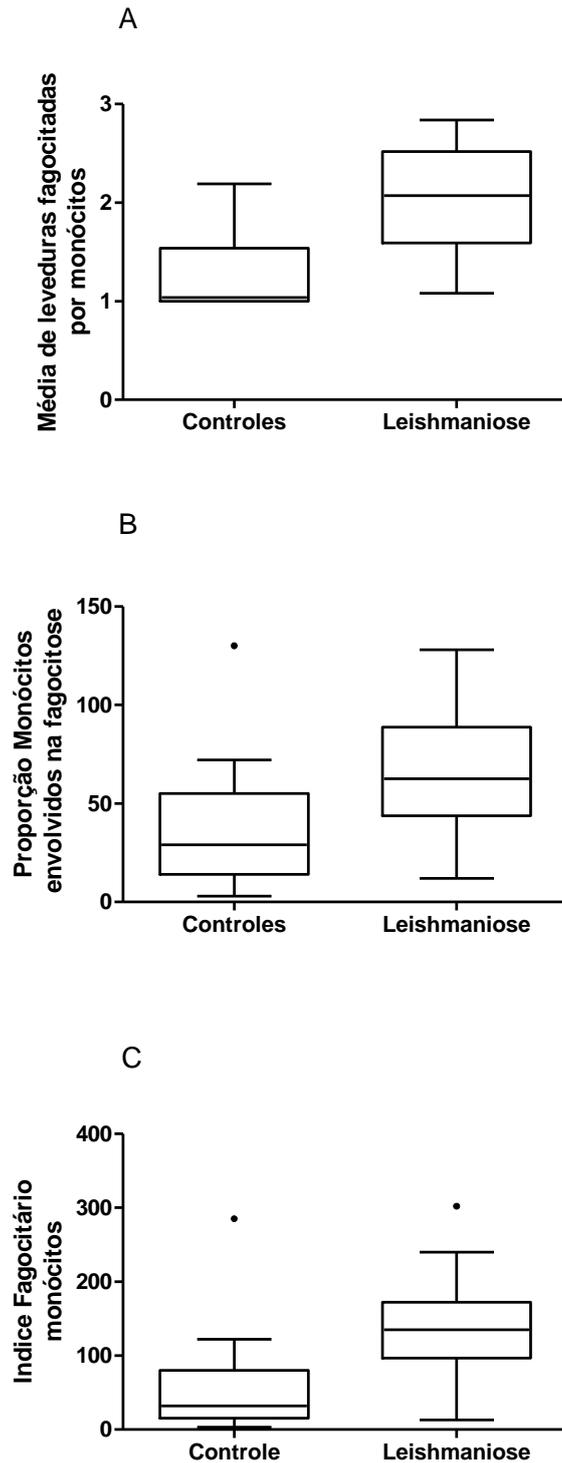


Figura 13 - Capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas, utilizando 5 *Saccharomyces cerevisiae* por monócito, comparada com a de cães controle normal. (A) Número de leveduras ingeridas por monócito ($p=0.0005$, Teste Mann-Whitney). (B) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,0368$, teste t). (C) Índice fagocitário dos monócitos ($p=0,0028$, Teste Mann-Whitney).

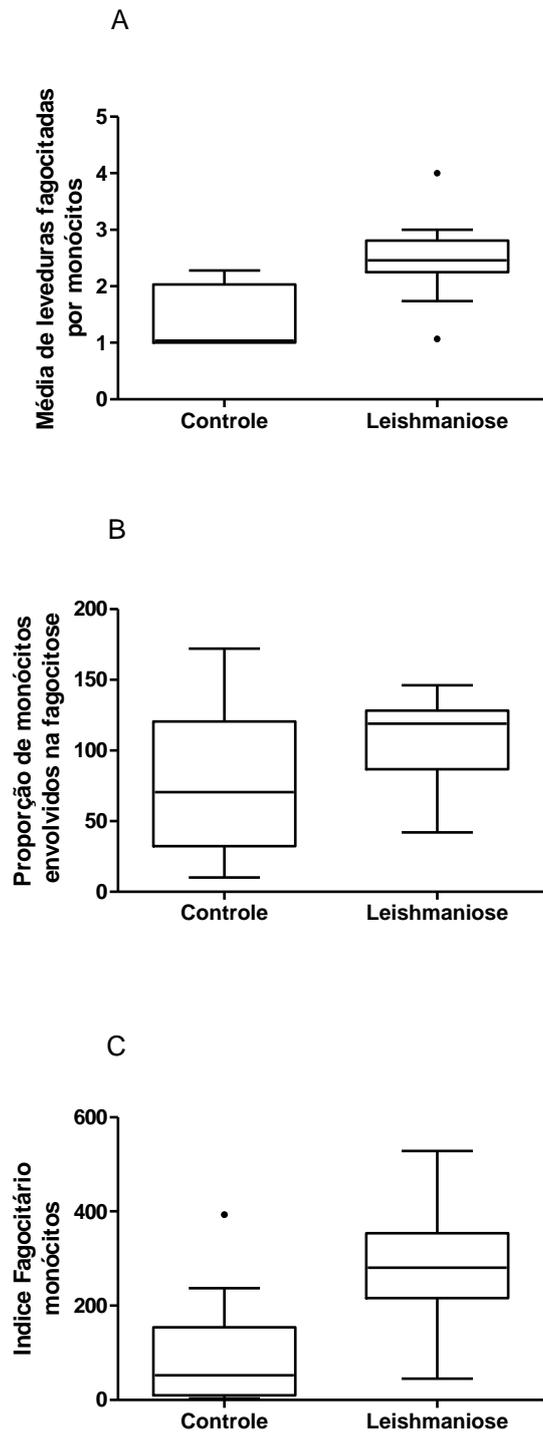


Figura 14 - Capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas, utilizando 20 *Saccharomyces cerevisiae* por monócito, comparada com a de cães controle normal. (A) Número de leveduras ingeridas por monócito ($p=0,0002$, Teste Mann-Whitney). (B) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,10$, Teste Mann-Whitney). (C) Índice fagocitário dos monócitos ($p=0,0008$, teste t).

5.2.3 Fagocitose por monócitos em placa

5.2.3 a. Por receptores para padrões moleculares de patógenos

Não houve diferença entre a capacidade fagocitária pelos monócitos de cães com leishmaniose e cães controle normais ($p > 0,05$) quando avaliados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, nas proporções de 5 ou 10 leveduras não sensibilizadas por monócito. (Figuras 15 e 16).

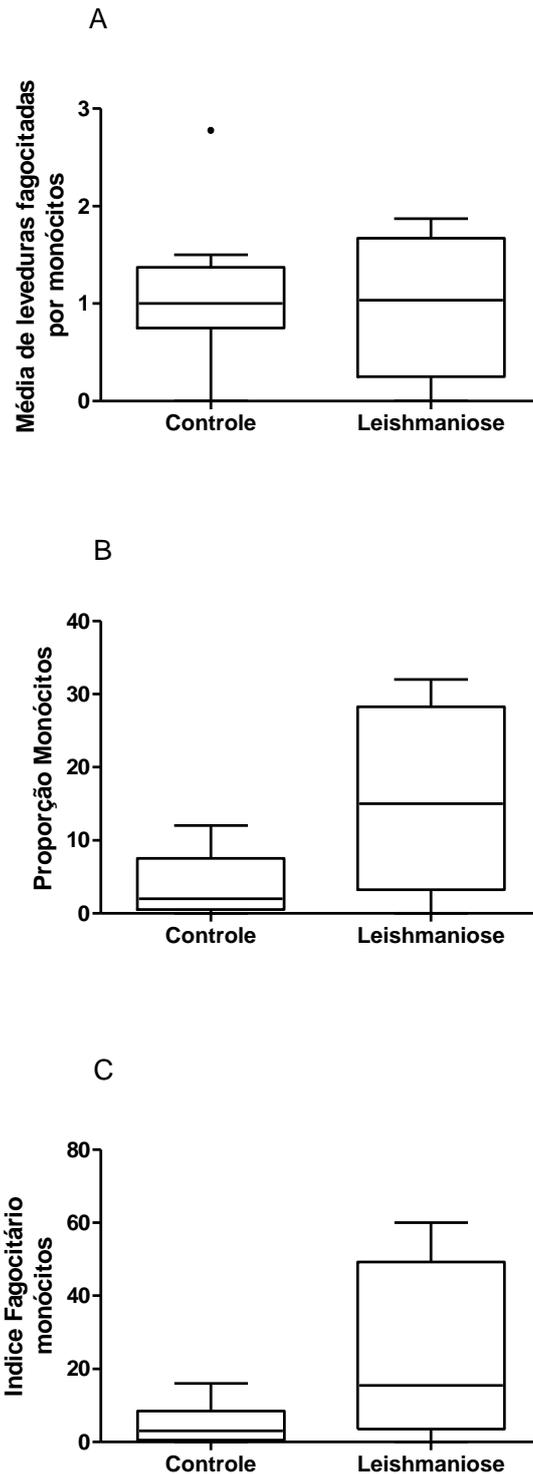


Figura 15 - Capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, utilizando 5 *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por monócito, em cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação a de cães controle normal. (A) Número de leveduras ingeridas por monócito ($p=0,83$, teste t). (B) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,18$, teste t com correção de Welch). (C) Índice fagocitário dos monócitos ($p=0,18$, Teste Mann-Whitney).

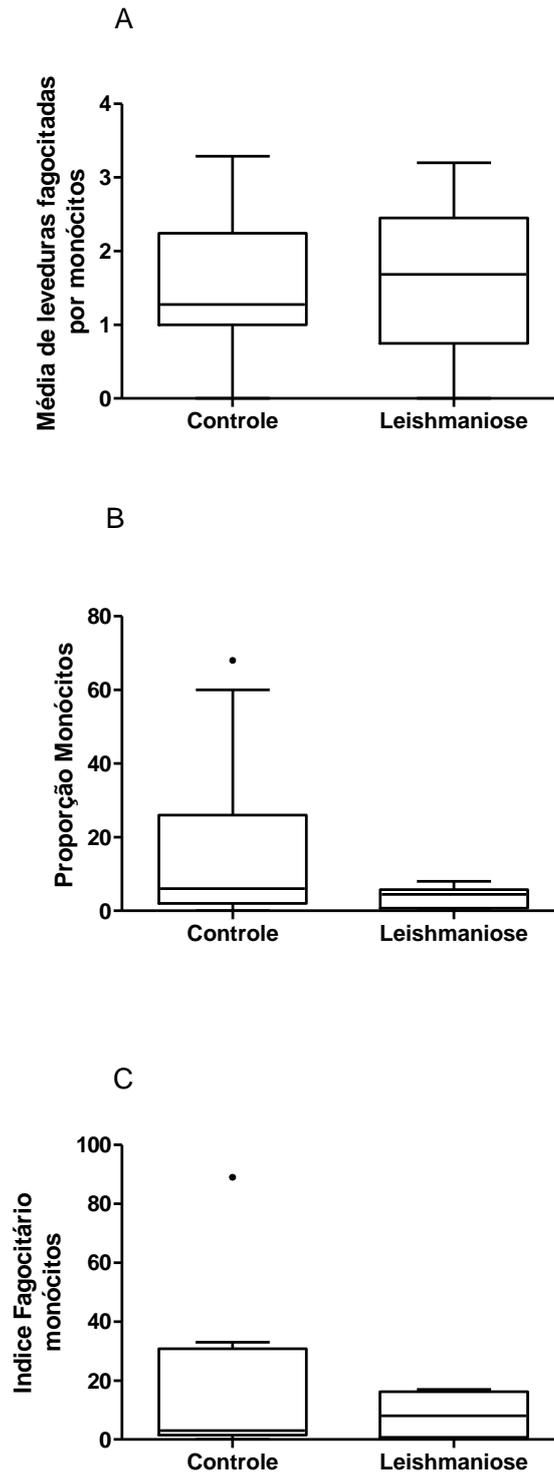


Figura 16 - Capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, utilizando 10 *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por monócito, em cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação a de cães controle normal. (A) Número de leveduras ingeridas por monócito ($p=0,66$, teste t). (B) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,06$, teste t com correção de Welch). (C) Índice fagocitário dos monócitos ($p=1.0$, Teste Mann-Whitney).

5.2.3 b. Por receptores para opsoninas

Não houve diferença entre a capacidade fagocitária pelos monócitos de cães com leishmaniose e cães controle normal ($p>0,05$) quando avaliados pelos receptores para **opsoninas**, nas proporções de 5 ou 10 leveduras não sensibilizadas por monócito. (Figuras 17 e 18).

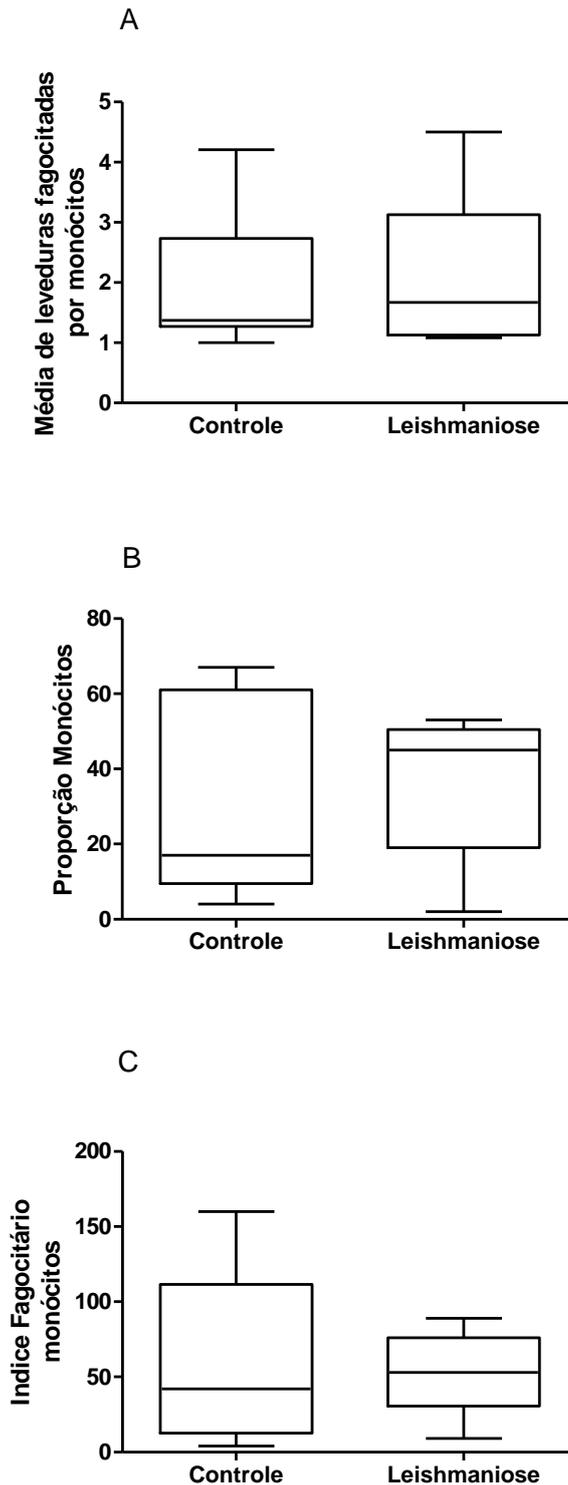


Figura 17 - Capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas, utilizando 5 *Saccharomyces cerevisiae* por monócito, comparada com a de cães controle normal. (A) Número de leveduras ingeridas por monócito ($p=0,89$, teste t). (B) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p=0,79$, Teste Mann-Whitney). (C) Índice fagocitário dos monócitos ($p=0,75$, teste t).

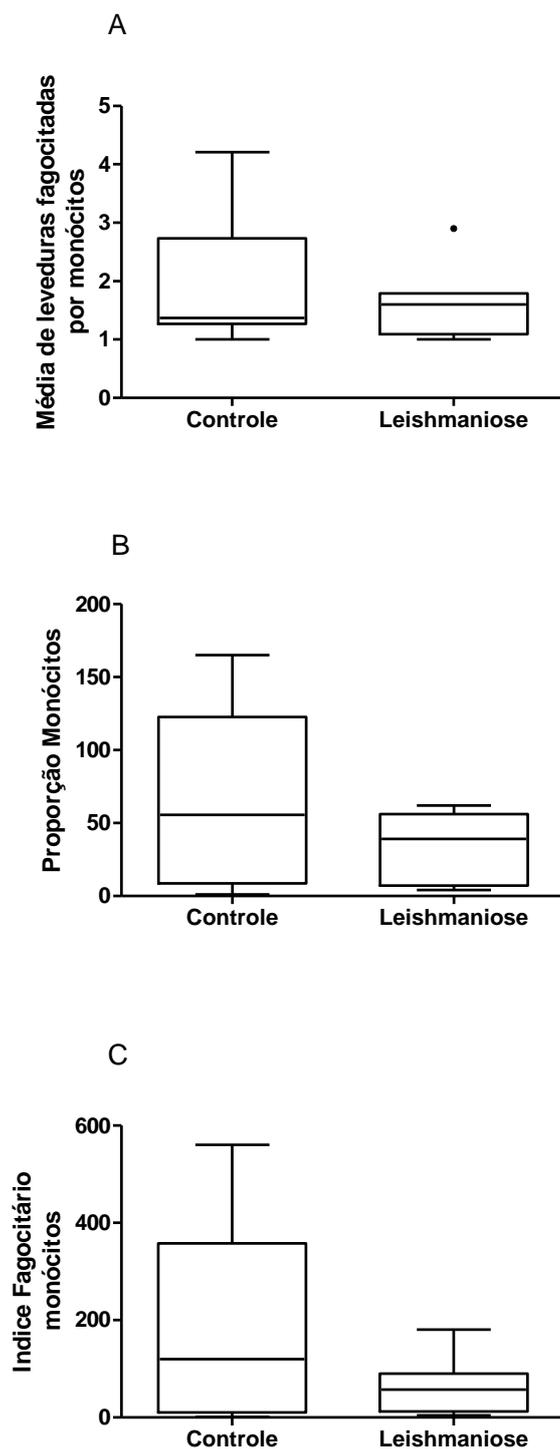


Figura 18 - Capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose pelos receptores para opsoninas, utilizando 10 *Saccharomyces cerevisiae* por monócito, comparada com a de cães controle normal. (A) Número de leveduras ingeridas por monócito não mostrou diferença significativa ($p= 1,0$, Teste Mann-Whitney). (B) Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose ($p= 0,14$, teste t com correção de Welch). (C) Índice fagocitário dos monócitos ($p=0,06$, teste t com correção de Welch).

5.3. Avaliação da produção de ânions superóxido pelo teste do NBT

A análise da capacidade microbicida dos fagócitos foi avaliada pela capacidade dessas células produzirem radicais de oxigênio, que foi determinada pela porcentagem de redução do NBT basal e estimulada.

A porcentagem de redução do NBT basal pelos fagócitos de cães com leishmaniose foi semelhante ao de cães controle ($p=0.09$, teste t). (Figura 19)

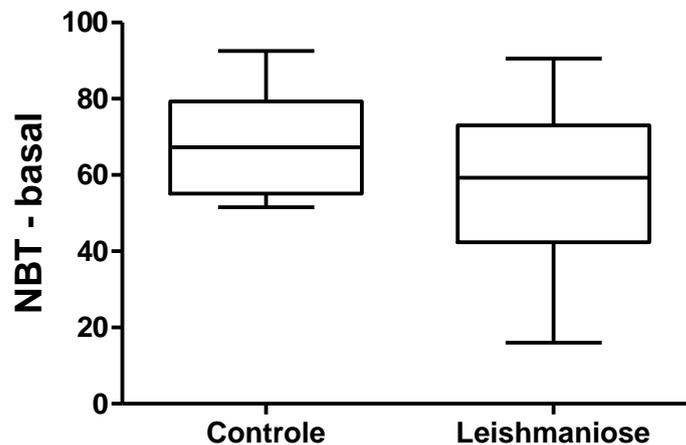


Figura 19 – Porcentagem de redução basal do NBT pelos fagócitos de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação com cães controle normal. ($p=0.09$, teste t).

A porcentagem de redução do NBT após estímulo com 10 leveduras por fagócito em cães com leishmaniose foi semelhante a de cães controle normal ($p=0.37$, teste t). (Figura 20)

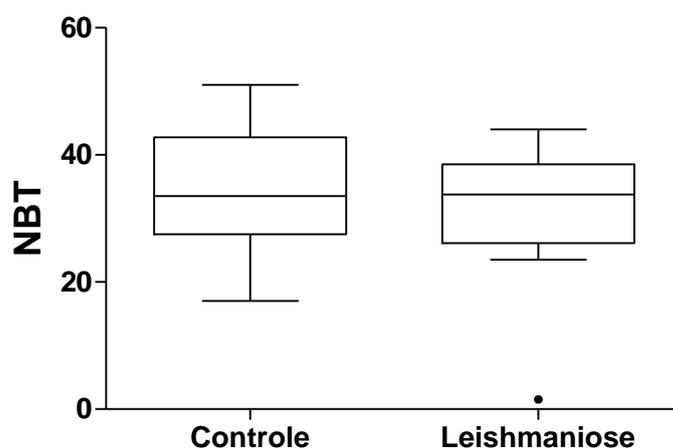


Figura 20 - Porcentagem de redução estimulada do NBT pelos fagócitos de cães naturalmente infectados por *Leishmania spp.* em comparação com cães controle normal. ($p=0,37$, teste t).

5.4 Produção de óxido nítrico

O óxido nítrico foi determinado pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas utilizando reagente de Griess, com e sem LPS. Observamos um aumento na produção do óxido nítrico em cães controles normais estimulados com $1\mu\text{g/mL}$ de LPS em relação à produção basal de óxido nítrico de cães controles normais ($p= 0,0015$, teste t). Entretanto, não houve diferença na produção basal de óxido nítrico de cães com leishmaniose em relação à produção de óxido nítrico estimulados com $1\mu\text{g/mL}$ de LPS de cães com leishmaniose. (Figura 21).

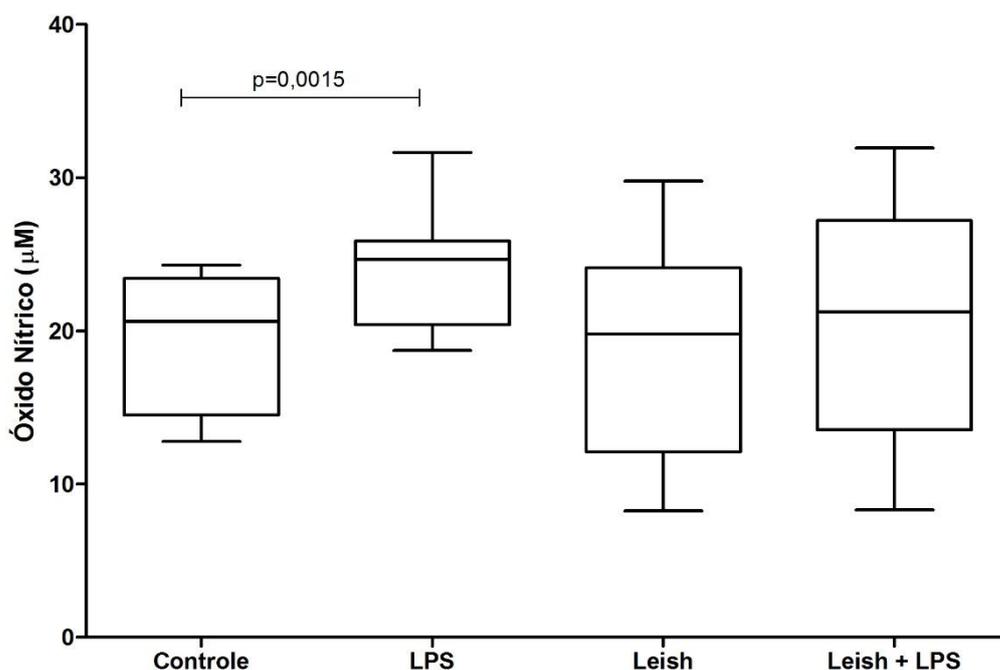


Figura 21 – Produção de Óxido nítrico em cães controles normais estimulados com 1µg/mL de LPS em relação à produção basal de óxido nítrico de cães controles normais e de cães com leishmaniose estimulados e não estimulados com 1µg/mL de LPS (p= 0,0015, teste t).

Quando utilizamos a concentração de 5 µg/mL de LPS, observamos que cães controles normais apresentaram um aumento da produção de óxido nítrico em relação a produção basal de cães controles normais (p= 0,007, teste t) (Figura 22). Nos cães com leishmaniose foi observado diminuição da produção de óxido nítrico quando estimulados com 5 µg/mL de LPS (p= 0,04, teste t) em relação a produção basal de óxido nítrico em cães com leishmaniose (Figura 22).

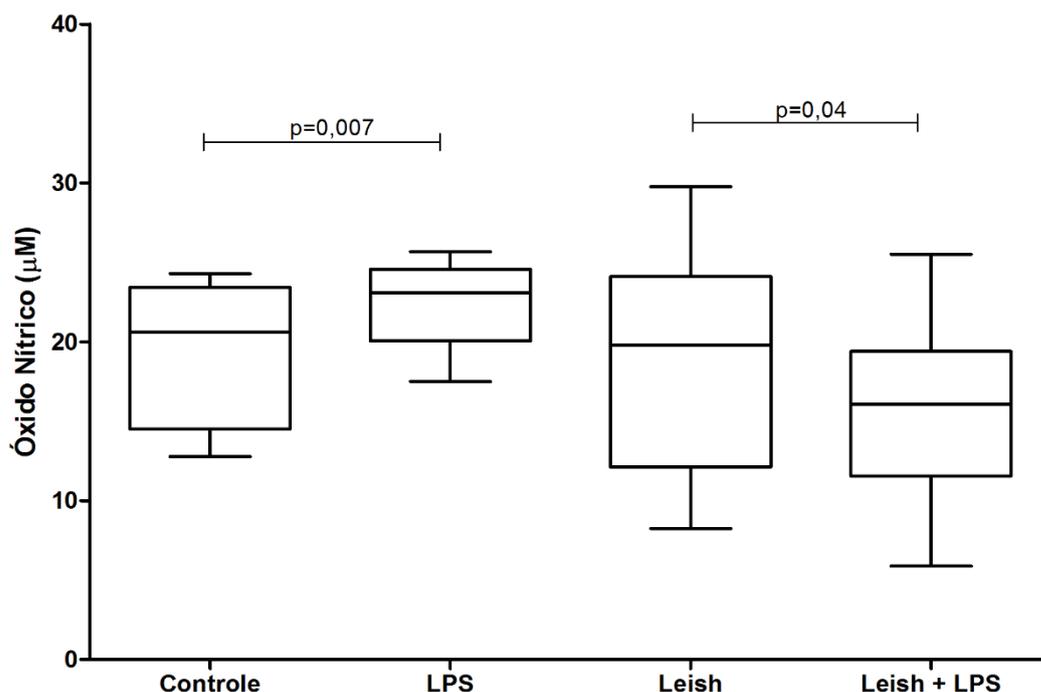


Figura 22 – Produção de óxido nítrico em cães controles normais estimulados com 5µg/mL de LPS em relação à produção basal de óxido nítrico de cães controles normais (p= 0,007, teste t) e de cães com leishmaniose estimulados e não estimulados com 5µg/mL de LPS (p= 0,04, teste t).

5.5 Produção de Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio foi determinado pelo método que consiste na oxidação do vermelho de fenol pela peroxidase na presença de H₂O₂, resultando em um produto que pode ser lido por colorimetria.

Observamos um aumento na produção do peróxido de hidrogênio em cães controles normais estimulados com 200nM de PMA em relação à produção basal peróxido de hidrogênio de cães controles normais (p= 0,04, teste t). A produção peróxido de hidrogênio basal de cães com leishmaniose foi maior do que em cães controles normais (p= 0,029, teste t). (Figura 23).

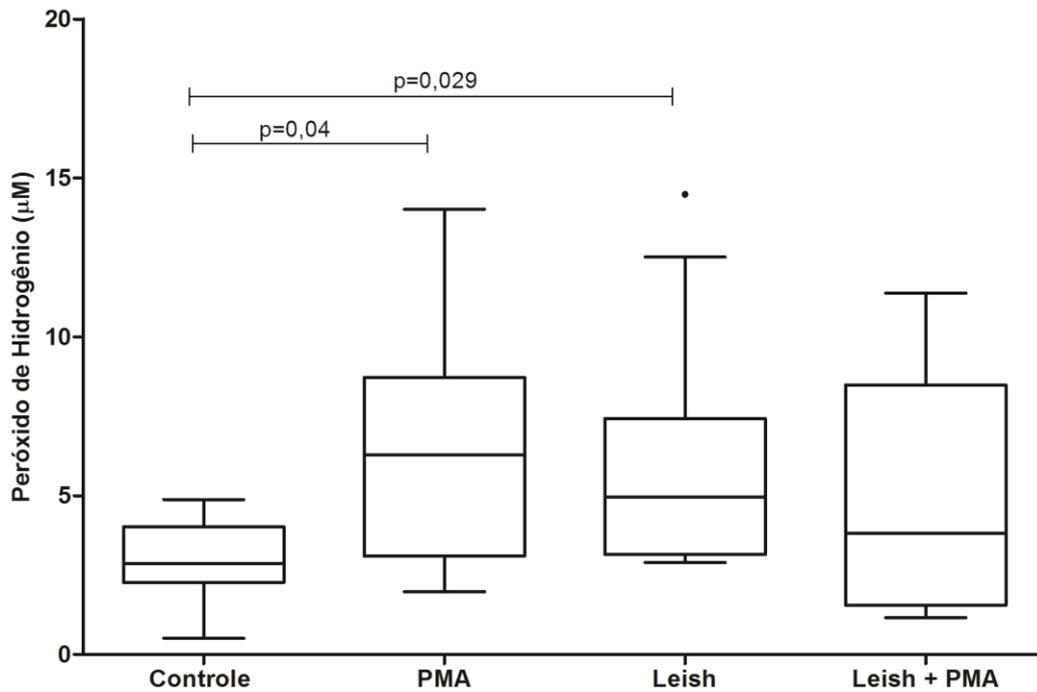


Figura 23 – Produção de peróxido de hidrogênio em cães controles normais estimulados com 200nM de PMA em relação à produção basal peróxido de hidrogênio de cães controles normais ($p= 0,04$, teste t) e de cães com leishmaniose estimulados e não estimulados com 200nM de PMA ($p= 0,029$, teste t).

DISCUSSÃO

Nosso trabalho avaliou a imunidade inata em cães com leishmaniose. Em relação aos aspectos clínicos e laboratoriais, nossos dados sugerem que os animais com leishmaniose encontravam-se em estado clínico de moderado a grave, considerado pela exuberância das apresentações clínicas. Observamos os seguintes sinais característicos da doença: alopecia (33%), descamação (46%), úlcera na pele (20%), onicogribose (26%), caquexia (46%), linfadenomegalia (40%) e ceratoconjuntivite (53%). Estes sinais não foram observados nos animais controle.

Os sinais clínicos apresentados por cães infectados por nós estudados mostrou-se semelhante ao observado previamente na literatura (Freitas et al. 2012).

Pela avaliação dos parâmetros hematológicos observamos que os animais encontravam-se anêmicos, detectada pela diminuição do número total de hemácias, do hematócrito e da hemoglobina nos cães com leishmaniose em relação aos cães normais. Entretanto, não foram observadas diferenças entre VCM, HCM e CHCM entre os cães com leishmaniose em relação aos cães normais, indicando que a anemia apresentada pelos animais com leishmaniose era normocrômica e normocítica. Nossos dados estão de acordo com as observações de Costa-Val et al 2007 e Freitas et al. 2012, que também mostraram redução do número de eritrócitos, hematócrito e da hemoglobina em comparação com os valores de referência para os cães. Anemia resulta em menor oxigenação tecidual que pode ser associada a sinais clínicos como letargia, anorexia e perda de peso (Thrall et al 2007). Anemia em cães naturalmente infectados com *Leishmania spp.* é um dos achados laboratoriais mais comuns em animais sintomáticos. No entanto, diversos fatores envolvidos no seu estabelecimento são complexos e pouco conhecidos apesar de estar relacionado com sangramento, processo inflamatório, insuficiência renal e alterações na medula óssea (Freitas et al. 2012).

Nos cães com leishmaniose por nós estudados, as plaquetas estavam diminuídas em relação aos cães normais. Este achado tem sido frequentemente observado em animais com leishmaniose, e alguns autores têm relatado que a trombocitopenia é característica da LVC (Cortese et al. 2011). Anteriormente, Costa-Val et al. (2007) observaram diminuição na contagem de plaquetas em 15% dos 42 cães com LVC estudados. A

trombocitopenia em cães com LVC pode ser resultante da vasculite devido à deposição de imunocomplexos, além do comprometimento da função renal e hepática favorecendo a destruição de plaquetas (Feldman, Zinkl & Jain 2000).

Observamos que os leucócitos totais estavam diminuídos nos cães com leishmaniose em relação aos cães normais. A análise da série branca mostrou leucopenia com neutrofilia relativa e desvio à esquerda. As formas em bastonete dos neutrófilos apresentaram-se maior em cães (8,0%) com leishmaniose do que em cães normais (2,0%) sendo que os animais com leishmaniose apresentaram 73% de neutrófilos segmentados contra 59% dos animais controles. Observamos que a porcentagem de eosinófilos de cães com leishmaniose (2,0%) foi menor do que em cães normais (11,0%). A porcentagem dos linfócitos em cães com leishmaniose (6%) também foi menor do que em cães normais (14%). Entretanto, não houve diferença na porcentagem monócitos entre cães com leishmaniose e normais. Diferente de Amusatogui et al. 2003, que verificaram uma tendência para o aumento dos níveis de leucócitos totais. Considerando os parâmetros clínicos e a leucopenia observada, é provável que os animais por nós estudados encontravam-se em uma fase mais avançada da doença.

Em nossos estudos, as proteínas totais (PT) mostraram-se aumentadas em cães com leishmaniose em relação a cães normais. Este aumento ocorreu as custas do aumento das globulinas, pois não houve aumento da albumina sérica. Doenças inflamatórias crônicas e imunomediadas podem ocasionar o aumento da concentração de PT em cães pelo aumento na fração de globulinas (Kerr 2003). As alterações bioquímicas mais comuns em cães com leishmaniose visceral observadas por Kiral et al. (2004) foram hiperproteinemia associada à hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. A Leishmaniose Visceral Canina pode levar à hipoalbuminemia e hiperglobulinemia independente da sintomatologia apresentada ou não pelos cães (Castro et al. 2012).

Os cães com leishmaniose por nós estudados, não apresentaram comprometimento hepático, como observado pelo encontro de níveis até diminuídos da atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) em relação aos cães normais. Em observações anteriores, não houve diferenças significativas entre as concentrações séricas de ALT, apesar de alguns autores verificarem valores moderadamente elevados desta enzima em cães com

leishmaniose (Castro et al. 2012; Kiral et al. 2004). Os valores de ALT diminuídos nos cães com leishmaniose, como observados por nós, parece não ter significado clínico patológico.

Os cães com leishmaniose não apresentaram também comprometimento renal, pois os valores de creatinina estavam dentro dos padrões de normalidade e não foram observadas diferenças na concentração sérica da creatinina entre os animais com leishmaniose e controles normais. A função renal avaliada por Alves et al. (2013), revelou que os cães infectados apresentaram níveis de ureia e creatinina mais elevados que cães normais, embora as diferenças não foram significativas. Nos estágios avançados da LVC, os valores médios de creatinina e ALT mostraram-se elevados, entretanto a porcentagem desses casos foi baixa (Amusategui et al. 2003).

O hemograma e a bioquímica são indispensáveis para avaliação do estado clínico do cão, contribuem para um melhor entendimento da patogênese da LVC, podem indicar a gravidade das lesões no auxílio ao prognóstico. Entretanto são limitados para o diagnóstico de cães com leishmaniose (Freitas et al 2012; Nicolato et al. 2013). Concluímos que os achados hematológicos analisados não são suficientes para diagnóstico de leishmaniose visceral canina. No entanto, a hipótese de leishmaniose deve ser considerada em cães provenientes de área endêmica para LVC que apresentarem uma associação de anemia e hiperproteinemia e outros exames complementares devem ser realizados para descartar ou diagnosticar a LVC. A alta frequência de sinais clínicos apresentados por cães infectados permitem observar que a doença evolui gradualmente a partir de um quadro clínico aparentemente normal para um estado com alguma manifestação clínica, que pode evoluir para uma forma clássica grave e terminal da doença, caracterizada por um maior número de sinais clínicos. Estes achados sugerem que a doença subclínica ou assintomática pode indicar que há um equilíbrio na interação parasito-hospedeiro (Reis et al. 2006).

Nosso trabalho avaliou a imunidade inata em cães com leishmaniose em comparação com cães normais pela capacidade de neutrófilos e monócitos fagocitarem leveduras, pela capacidade dos fagócitos produzirem ânions superóxido, pela capacidade dos monócitos produzirem óxido nítrico e peróxido de hidrogênio.

Nossos dados mostraram que a fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* pelos neutrófilos, quando avaliada por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos, foi menos eficiente nos cães com leishmaniose do que cães controles normais não infectados por este parasito, pelo menor envolvimento de neutrófilos na fagocitose, quando avaliados pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, utilizando 20 leveduras por fagócitos.

Quando analisamos a fagocitose por neutrófilos facilitada por opsoninas, observamos que, embora o número de leveduras ingeridas por neutrófilo foi maior em cães com leishmaniose do que nos cães controles normais, houve uma tendência para menor envolvimento dos neutrófilos na fagocitose, resultando que não houve alteração na capacidade final dos neutrófilos para fagocitarem as leveduras na presença de opsoninas.

Diferente de nossos resultados, Bradionísio et al (1996), avaliando a fagocitose por células polimorfonucleares e utilizando a forma promastigota da leishmânia na proporção de 2 leishmânias por fagócito e *Cândida albicans* na proporção de 3 fungos por fagócito como partículas a ser fagocitada, mostraram que a porcentagem de fagocitose por neutrófilos de cães infectados foi maior do que em cães saudáveis quando utilizaram a leishmânia, mas não houve diferença entre os infectados e normais quando utilizaram o fungo. As diferenças observadas com os nossos resultados devem ter ocorrido pelo fato de que em nossos experimentos utilizamos uma proporção muito maior de leveduras, o que pode ter facilitado a demonstração da deficiência dos neutrófilos. Diferenças nas formas clínicas entre os animais estudados pode também responder pelas diferenças encontradas, desde que tem sido mostrado que a função dos fagócitos tem relação com a gravidade das formas clínicas da leishmaniose nos cães (Almeida et al 2013).

A menor capacidade fagocitária dos neutrófilos em nossos experimentos foi determinada pelo menor envolvimento dos fagócitos na fagocitose. A fagocitose é um processo complexo que requer ação coordenada de sinalização que conduz a diversos eventos como remodelação da actina e alterações no transporte de membrana. Como a deficiência observada ocorreu pelo menor envolvimento dos fagócitos na fagocitose é possível que tenha sido determinada pela menor capacidade de quimiotaxia destes fagócitos,

possivelmente ocasionada pela produção de citocinas inibitórias estimuladas pela infecção pela leishmânia. A maior capacidade de ingestão de leveduras na presença de opsoninas deve ter ocorrido pela maior expressão de receptores para complemento e/ou de receptores para a fração Fc das imunoglobulinas, possivelmente determinada pela ativação dos fagócitos pelas citocinas induzidas pela infecção pela leishmânia. Entretanto, como a quimiotaxia possivelmente estava diminuída, como discutido acima, isto determinou que um menor número de neutrófilos tenham fagocitado as leveduras, resultando que a capacidade fagocitária final dos neutrófilos na presença de opsoninas não foi diferente da dos animais normais, apesar da maior ingestão de partículas por cada fagócito.

Por outro lado, os monócitos de cães com leishmaniose apresentaram maior capacidade fagocitária em comparação aos de cães normais, quando testado pelos receptores para opsoninas. O aumento do índice fagocitário deveu-se tanto ao aumento da proporção de monócitos envolvidos na fagocitose quanto ao maior número de leveduras ingeridas por monócito. No entanto, não houve diferença entre a capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose e cães controles normais, quando avaliados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.

Diferente do que observamos em nosso estudo, Bradionísio et al (1996), avaliando monócitos de cães com leishmaniose quanto à sua capacidade de ingerir promastigotas de leishmânia, observaram menor capacidade fagocitária dos monócitos em comparação ao de cães normais. Além disso, soros de cães infectados com leishmânia diminuíram a capacidade fagocitária de monócitos de cães sadios, enquanto que os soros de cães sadios restabeleceram a fagocitose pelos monócitos dos em animais com leishmaniose. Foram observados resultados semelhantes quando *Cândida albicans* foi usada como partícula a ser fagocitada. Isso sugere um possível papel de fatores presentes no soro dos animais infectados sobre o comprometimento da fagocitose na infecção por leishmânia. Este fato pode estar relacionado com a produção de moléculas regulatórias da atividade dos fagócitos, como IFN- γ , FNT- α e IL-2 (Barbiéri 2006; Saridomichelakis 2009), porém não quantificadas no presente estudo. Os monócitos sobrevivem por mais tempo que neutrófilos e esta característica é clinicamente importante, devido ao fato que estas células

podem proteger os animais a partir do momento que neutrófilos não conseguem conter a infecção (Dale, Boxer & Liles 2008).

Os monócitos expressam grande número de proteínas em sua superfície celular, que desempenham importantes funções na biologia do fagócito. Receptores de reconhecimento de padrões microbianos são componentes essenciais da imunidade inata, reconhecem e detectam padrões moleculares associados a patógenos, ativando monócitos e neutrófilos como parte da resposta do hospedeiro para eliminar microrganismos invasores. Os receptores do tipo Toll são uma importante família de receptores que reconhecem diversos patógenos e são expressos em maior número em monócitos do que em neutrófilos. Após a ligação dos seus ligantes específicos, os receptores semelhantes ao Toll enviam um sinal envolvendo a proteína adaptadora MyD88 para ativar a via do NF- κ B e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (Dale, Boxer & Liles 2008).

Um dos importantes mecanismos microbicidas utilizados nas infecções intracelulares se refere à formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que foram avaliadas pela capacidade de produção do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico.

Avaliamos a capacidade microbicida dos neutrófilos pela produção de ânions superóxido, pela determinação da porcentagem de redução do NBT basal e estimulada. Fagócitos de cães com leishmaniose apresentaram menor capacidade de produção basal de ânions superóxido do que os cães controles normais, pelo teste do NBT. Nossos dados foram diferentes dos resultados de outros estudos que também utilizaram o método NBT. Ciarlini et al 2010 e Gomez-Ochoa et al (2010) observaram um aumento da produção de ânion superóxido em cães com leishmaniose. Entretanto, nossos dados concordam com as observações de Almeida et al (2013) que mostraram que a produção de ânions superóxido dependeu da forma clínica da leishmaniose, em que cães com estágios mais precoce da doença mostraram aumento da produção do ânion superóxido e os animais sintomáticos no estágio moderado da doença apresentaram deprimida produção do ânion de superóxido, como observado por nós. Em nossos estudos não foram considerados os estágios da doença, entretanto, os animais por nós estudados apresentavam sintomas evidentes da doença, como alopecia, descamação, úlcera na pele, onicogribose, caquexia,

linfadenomegalia e ceratoconjuntivite, sugerindo que estavam em uma fase mais avançada da evolução da leishmaniose.

O fato de que a produção de ânions de superóxido pelos fagócitos dos cães infectados pela leishmânia ter sido significativamente menor do que pelos fagócitos de cães controles sugere que a diminuição da produção de ânion superóxido pode dificultar a defesa contra o parasito e favorecer a disseminação da infecção, já que o mecanismo microbicida pela produção dos ânions superóxido por estas células não está ocorrendo de forma eficaz (Bradionísio et al. 1996).

Observamos neste trabalho que a produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos dos cães com leishmaniose foi maior do que em cães controles normais. Este aumento pode estar relacionado com o aumento da fagocitose pelos monócitos, conforme observamos neste trabalho. A produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos dos cães controles normais aumentou quando estimulado com PMA, o que mostra que o nosso sistema estava adequado para avaliação da produção deste radical. Bradionísio et al (1996) mostraram que fagócitos de cães controles produziram maior quantidade de peróxido de hidrogênio do que cães infectados, sendo que a explosão respiratória diminuída em cães com leishmaniose pode, em parte, justificar a longa duração e gravidade doença.

É possível que a diferença por nós observada nesse trabalho entre a produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido tenha ocorrido pelo fato de que a produção do peróxido de hidrogênio foi quantificada no sobrenadante das culturas dos monócitos, que também apresentaram uma maior capacidade fagocitária. Enquanto a produção de ânions superóxido foi avaliada em uma população de células em que predominam os neutrófilos, que também mostraram uma menor capacidade fagocitária.

A produção de óxido nítrico mostrou-se diminuída em cães com leishmaniose quando estimulados com LPS em relação à sua própria produção basal. Enquanto que, cães normais apresentaram um aumento da produção de óxido nítrico em relação à sua própria produção basal, quando estimulados pelo LPS. Nossos dados estão de acordo com as observações de Pinelli et al (2000) em que os macrófagos caninos ativados produziram menor quantidade de NO, além disso, a adição de LPS aos macrófagos caninos não resultou na

produção de NO por estas células, conforme nossas observações. Os mecanismos de ativação dos macrófagos caninos que resultam na produção de NO e a atividade leishmanicida requerem um estudo mais aprofundado.

Devemos considerar como uma limitação do nosso trabalho a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* mortas e não as leishmânias como partícula a ser fagocitada. Entretanto, o fato de usarmos a levedura morta, propicia uma melhor avaliação da função do fagócito em si, sem a interferência determinada pela própria leishmânia sobre os fagócitos, na interação parasito-hospedeiro. Além disso, de acordo com Underhill & Ozinsky (2002), as leveduras possuem receptores para o complemento e receptores para manose-fucose, que são os mesmos receptores utilizados pelos fagócitos para a fagocitose das leishmânias (Handman & Bullen 2002).

Nossos resultados mostraram que há uma deficiência dos neutrófilos de cães com leishmaniose tanto na fagocitose quanto na produção de moléculas microbidas, como os ânions superóxido. Entretanto, os monócitos desses cães embora apresentem uma maior capacidade fagocitária do que os cães normais, mostram uma menor capacidade de produzir óxido nítrico, que é uma das principais moléculas microbidas para as leishmânias. Estas alterações do sistema imunitário inato podem favorecer o escape do parasito do sistema imunitário do hospedeiro, assim perpetuando sua sobrevivência. Ademais, o aumento da produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos, pode estar contribuindo para restringir em parte o crescimento do parasito, mas o seu excesso pode também estar contribuindo nos mecanismos de imunopatogenia. Nossos dados contribuem para uma maior compreensão dos mecanismos de defesa da imunidade inata e da imunopatogenia da leishmaniose em cães e podem contribuir para a busca de novos alvos para drogas imunomoduladoras que possam auxiliar no tratamento contra a leishmaniose.

Nossos resultados mostraram que ainda são necessárias novas investigações para melhor compreensão dos receptores envolvidos na ingestão dos parasitos pelas células do sistema fagocitário, como também uma melhor avaliação das moléculas presentes nas leishmânias que se ligam a estes receptores. Além disso, ainda falta uma melhor compreensão dos componentes do soro envolvidos na modulação das funções dos fagócitos, para entender como esta interação pode desempenhar um papel importante na doença.

Assim como, compreender quais e como são utilizados os mecanismos para inibição da produção de óxido nítrico e se de alguma forma esta deficiência favorece a sobrevivência do parasito nos fagócitos. O aumento da produção de peróxido de hidrogênio pode participar dos mecanismos de defesa, mas é necessário também avaliar sua participação nos mecanismos de agressão imunomediadas e sua participação na patogenia da leishmaniose.

CONCLUSÕES

1) Cães com leishmaniose apresentaram menor capacidade fagocitária pelos neutrófilos do que cães normais, pelo menor envolvimento de neutrófilos na fagocitose, quando avaliados pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos utilizando 20 leveduras por fagócitos. Entretanto, não houve alteração da capacidade fagocitária dos neutrófilos quando analisamos a fagocitose facilitada por opsoninas.

2) Os monócitos de cães com leishmaniose apresentaram maior capacidade fagocitária em comparação aos de cães normais pelos receptores para opsoninas. No entanto, não houve diferença entre a capacidade fagocitária dos monócitos de cães com leishmaniose e cães controle normais, quando avaliados pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.

3) Neutrófilos de cães com leishmaniose apresentaram menor capacidade de produção basal de ânions superóxido do que os cães controle normal, pelo teste do NBT.

4) Quando estimulados com 5µg/ ml de LPS, os monócitos dos cães com leishmaniose produziram menor quantidade de óxido nítrico do que os seus monócitos na ausência do estímulo.

5) A produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos de cães com leishmaniose foi maior do que a de cães controles normais.

Nossos resultados mostraram que há uma deficiência dos neutrófilos tanto na fagocitose quanto no mecanismo microbicida para eliminar o patógeno, o que favorece o escape pelo parasito do sistema imunitário do hospedeiro, assim perpetuando sua sobrevivência. Os monócitos, embora apresentem uma maior competência para fagocitose, são deficientes na produção de óxido nítrico, que é reconhecido como um dos principais mecanismos leishmanicida dos fagócitos. A aumentada produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos pode estar participando tanto dos mecanismos de defesa da imunidade inata, quanto dos mecanismos de imunoagressão. Os

nossos dados podem contribuir para a busca de novos alvos para drogas imunomoduladoras que possam auxiliar no tratamento contra a leishmaniose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, BFM, Narciso, LG, Bosco, AM, Pereira PP, Braga, ET, Avanço, SV, Marcondes, M & Ciarlini, PC 2013, 'Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis'. *Vet. Parasitol.* 196: 6-12.

Alves, GBB, Silva, LS, Batista, JF, Campos, AP, Prianti, MG & Costa, FAL 2013. 'The sero-conversion and evaluation of renal alterations in dogs infected by *Leishmania (Infantum) chagasi*'. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 55 (2): 105-112.

Amusatogui, I Sainz, A, Rodríguez, F & Tesouro, MA. 2003, 'Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in Canine Leishmaniasis'. *European Journal of Epidemiology.* 18: 147-156.

Awasthi, A, Mathur, RK & Saha, B 2004, 'Immune response to *Leishmania* infection'. *Indian J Med Res.* 119(6): 238-58.

Badaró, R & Duarte, MIS 2005 'Leishmaniose Visceral (Calazar)'. In: *Tratado de Infectologia.* Focaccia, R. Veronesi: 3ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.1561-1590.

Baneth, G, Alexander F, Koutinas, AF, Solano-Gallego, L, Bourdeau, P & Ferrer, L 2008 'Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one'. *Trends Parasitol.* 24(7): 324-330.

Barbiéri, CL 2006 'Immunology of canine leishmaniasis'. *Parasite Immunol.* 28(7) : 329-337.

Barboza-Marques SM. Estado de ativação dos eosinófilos e função fagocitária de neutrófilos e monócitos em crianças asmáticas. Dissertação de Mestrado, Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

Beattie, LE & Kaye, PM 2011 '*Leishmania*–host interactions: what has imaging taught us?' *Cell Microbiol.* 13(11): 1659-1667.

Boggiatto, PM, Ramer-tait, AE, Metz, K, Kramer, EE, Gibson-Corley, K, Mullin, K, Hostetter, JM, Gallup, JM, Jones, DE & Petersen, CA 2010. 'Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection' *Clin Vaccine Immunol.* 17(2): 267-273.

Brandonísio, O, Panunzio, M, Faliero, SM, Ceci, L, Fasanella, A & Puccini, V 1996. 'Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum* infected dogs'. *Vet Immunol Immunopathol.* 53: 95-103.

Brasil 2010, 'Manual de Doenças infecciosas e parasitárias'. *Guia de vigilância Epidemiológica.* Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, DF.

Castro, IP, Sousa, MVC, Magalhães, GM, Mundim, AV, Noleto, PG, Paula, MBC, Pajuaba-Neto, AA & Medeiros, AA. 2012. 'Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral'. *Bioscience Journal.* 28(5): 799-804.

- Ciarlini, PC, Valadares, TC, Ikeda-Garcia, FA, Marcondes, M, Lima, VFM 2010. Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. *Ciência Animal Brasileira*. 11: 369-375.
- Collignon, C, Zahra, A, Guenego, L, Gautier, R & Madelenat, A 2009. 'Polyarthrite associée à une Leishmaniose chez un jeune chien'. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. 44: 27-34.
- Cortese, L, Terrazzano G, Piantedosi D, Sica M, Prisco M, Ruggiero G & Ciaramella, P 2011. 'Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*'. *Vet J*. 188: 118-121.
- Costa, CHM, Tapety, CMM & Werneck, GL 2007. 'Controle da Leishmaniose Visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial'. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40(4): 415-419.
- Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Senhorini IL, Silva TC & Guerra JL 2003. 'Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis'. *Vet Pathol*. 40: 677-684.
- Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MS, Alexander B, Williams P & Melo MN 2007. 'Canine Visceral Leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity'. *Vet J*. 174: 636-643.
- Dale, DC, Boxer, L & Liles, WC 2008. 'The phagocytes: neutrophils and monocytes'. *Blood*. 112(4): 935-945.
- Dantas-Torres, F & Brandão-Filho, SP 2006. 'Visceral Leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control'. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 48(3): 151-156.
- Dantas-Torres, F 2007. 'The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*'. *Vet Parasitol*. 149: 139-146.
- Dantas-Torres, F, Solano-Gallego, L, Baneth, G, Ribeiro, VM, Otranto, D 2012. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol*. 28(12): 531-538.
- Desjeux, P 2004. 'Leishmaniasis: current situation and new Perspectives'. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 27: 305-318.
- Dias, EL, Batista, ZS, Guerra RMSNC, Calabrese, S, Lima, TB & Abreu-Silva, A L 2008. 'Canine Visceral Leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão state, Brazil'. *Ciênc. Anim. Bras*. 9(3): 740-745.

Evans, DA & Rebêlo, ME 1996. *Handbook of Visceral-Cutaneous Leishmaniasis in The Domestic Dog*. Lisboa: Sacavanense, p.67.

Feldman, BV, Zinkl, JG & Jain, NC 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*. Canada: Lippincott Williams & Wilkins.

Freitas, JCC, Nunes-Pinheiro, DCS, Neto, BEL, Santos, GJL, Abreu, CRA, Braga, RR, Campos, RM & Oliveira, LF 2012. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45(1): 24-29.

Fondevila, D, Vilafranca, M & Ferrer, L 1997. 'Epidermal immunocompetence in Canine Leishmaniasis'. *Vet Immunol and Immunopathol.* 56: 319-327.

Fortes, E 1997. *Parasitologia Veterinária*. 3ed. São Paulo: Ícone.

Green LC, De Luzuriaga KR, Wagner DA, Rant W, Istfan N, Young VR 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78: 7764-7768.

Gómez-Ochoa, P, Lara, A, Couto, G, Marcen, JM, Peris, A, Gascón, M & Castillo, JA, 2010. The nitroblue tetrazolium reduction test in canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 172: 135-138.

Gontijo, CMF & Mello, MN 2004. 'Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas'. *Rev Bra Epidemiol.* 7(3): 338-349.

Handman, E & Bullen, DVR 2002. 'Interaction of *Leishmania* with the host macrophage'. *Trends Parasitol.* 18(8): 332-334.

Kerr, MG 2003. *Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia*. São Paulo: Roca.

Kiral, FK, Seyrek, K, Pasa, S, Ertabaklar, H & Unsal, C 2004. 'Some haematological, biochemical and electrophoretic findings in dogs with visceral leishmaniasis'. *Revue Médecine Vétérinaire.* 155: 226-229.

Koutinas, AF & Koutinas, CK 2014, 'Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*'. *Vet Pathol.* 51(2): 527-538.

Laskay, T, Zandbergen, GV & Solbach, W 2003, 'Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?'. *Trends Microbiol.* 11: 210-214.

Lachman, PJ & Hobart, MJ 1978, 'Complement technology, Handbook of Experimental Immunology'. In *Immunochemistry Chapter 5A*, ed Weir, DM. 1ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978.

Michalick, MSM & Ribeiro, RR 2011 'Leishmaniose Visceral Americana'. In: *Parasitologia Humana*. Neves, DP: 12ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.69-88.

Moshfe, A, Mohebal, M, Edrissian, G, Zarei, Z, Akhoundi, B, Kazemi, B, Jamshidi, S & Mahmoodi M 2009, 'Canine visceral leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection'. *Acta Tropica*. 112(2): 101-105.

Muniz-Junqueira, MI, Santos-Neto, LL & Tosta, CE 2001. Influence of Tumor Necrosis Factor- α on the Ability of Monocytes and Lymphocytes to Destroy Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in Vitro. *Cell Immunol*. 208(2): 73-79.

Muniz-Junqueira, MI, Peçanha, LMF, Silva-Filho, VL, Cardoso, MCA & Tosta, CE 2003. Novel Microtechnique for Assessment of Postnatal Maturation of the Phagocytic Function of Neutrophils and Monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 10: 1096-1102.

Nicolato, RC, Abreu, RT, Roatt, BM, Aguiar-Soares, RDO, Reis, LES, Carvalho, MG, Carneiro, CM, Giunchetti, RC, Bouillet, LEM, Lemos, DS, Coura-Vital, W & Reis, AB 2013. Clinical Forms of Canine Visceral Leishmaniasis in Naturally *Leishmania infantum*-Infected Dogs and Related Myelogram and Hemogram Changes. *Plos One*. 8(12).

Olivier, M, Gregory, DJ & Forget, G 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. 18(2): 293-305.

Panaro, MA, Acquafredda, A, Lisi, S, Lofrumento, DD, Mitolo, V, Sisto, M, Fasanella, A, Trotta, T, Bertani, F, Consenti, B & Bradonísio, O 2001. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 24: 187-195.

Pick, E. & Mizel, D 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. 46: 211-226.

Pinelli, E, Killick-Kendrick, R, Wagenaar, J, Bernadina, W, Del Real, G & Ruitenber, EJ 1994, 'Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*'. *Infect Immun*. 62(1): 229-235.

Pinelli, E, Gebhard, D, Mommaas, AM, Hoeij MV, Langermans, JAM, Ruitenber, EJ & Rutten, VPMG 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol*. 92(3): 181-189.

Queiroz, PVS, Monteiro, GRG, Macedo, VPS, Rocha, MAC, Batista, LMM, Queiroz, JW, Jerônimo, SMB, Ximenes, MFFM 2009, 'Canine Visceral Leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil'. *Res Vet Sci*. 86: 267-273.

Reis, AB, Guiunchetti, RC, Carrillo, E, Martins-Filho, OA & Moreno, J 2010. 'Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis'. *Trends Parasitol.* 26(7): 341-349.

Reis, AB, Martins-Filho, AO, Teixeira-Carvalho, A, Carvalho, MG, França-Silva, JC, Giunchetti, RC, 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(1): 68-75.

Reithinger, R & Davies, CR 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(4): 530-54.

Rey, L. *Parasitologia.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan S.A. 2001. 456 p.

Ribeiro-Gomes, FL & Sacks, D 2012. 'The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection'. *Front Cell Infect Microbiol.* 2: 59.

Rittig, MG & Bogdan C 2000. *Leishmania* – Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. *Parasitol Today.* 16: 292-297.

Saridomichelakis, MN 2009. 'Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications'. *Vet Dermatol.* 20: 471-489.

Shaw, J 2007. 'The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world, a mini-review'. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102(5): 541-547.

Silva, FS 2007, 'Patologia e patogênese da Leishmaniose Visceral Canina'. *Rev Trop: Ci Agr Bio.* 19(1): 20-31.

Silva, LA & Prata, A 2013 'Calazar'. In: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.* Coura, J R.: 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.761-779.

Solano-Gallego, L, Koutinas, A, Miró, G, Cardoso, L, Pennisi, MG, Ferrer, L, Bourdeau, P, Oliva, G & Baneth, G 2009. 'Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis'. *Vet Parasitol.* 165: 1-18.

Svensjö E, Saraiva EM, Bozza MT, Oliveira SM, Lerner EA & Scharfstein J. 2009. 'Salivary Gland Homogenates of *Lutzomyia longipalpis* and Its Vasodilatory Peptide Maxadilan Cause Plasma Leakage via PAC1 Receptor Activation'. *J Vasc Res.* 46: 435-446.

Thrall, MA. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária.* São Paulo: Roca, 2007, 582p.

Torres-Neto, R, MMP, Amorim, RL, Conceição, LG, Luvizotto, MCR & Franco, S R V S 2008. 'Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose'. *Semina: Ciências Agrárias*. 29(3): 667-676.

Underhill, DM & Ozinsky, A 2002. 'Phagocytosis of microbe: complexity in action'. *Annu Rev Immunol*. 20: 825-852.

Wittmann, C, Chockley, P, Singh, SK, Pase, L, Lieschke, GJ e Grabher, C 2012. 'Hydrogen Peroxide in Inflammation: Messenger, Guide, and Assassin'. *Advances in Hematology*. 2012.

WHO 2013. World Health Organization. Leishmaniasis: Forms of leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

ANEXOS



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 18 de fevereiro de 2014.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO INATO DE CÃES À **INFECÇÃO NATURAL PELA LEISHMÂNIA, CÃES NÃO INFECTADOS E CÃES VACINADOS.**", UnBDOC n.º 134225/2013, sob responsabilidade da Professora Maria Imaculada M. B. Junqueira foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Fernando Pacheco Rodrigues
Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

Valores de referências (Caninos)

Bioquímica

CREATININA (mg/dl)	0,5 a 1,8
TGP/ALT (U/l)	10 a 40
PROTEÍNAS TOTAIS (g/dl)	6,5 a 7,0
ALBUMINA (g/dl)	2,7 a 3,2
GLOBULINA (g/dl)	2,8 a 3,2
CREATININA (mg/dl)	0,5 a 1,8

Valores de referência CID-vet.

Hemograma

He x 10 ⁶ / mm ³	6,4 a 7,7
Ht%	45 a 52
Hb g%	15,8 a 17,7
VCM fL	60,0 a 72,0
HCM pg	20,0 a 24,0
CHCM%	30,0 a 36,4
Plaquetas / mm ³	200 a 500.000
Leucócitos totais / mm ³	6.000 a 13.000
Neutrófilos / mm ³	3500 a 10.000
Eosinófilos / mm ³	200 a 1000
Basófilos / mm ³	0 a 150
Linfócitos / mm ³	1000 a 4500
Monócitos / mm ³	200 a 1000

Valores de referência CID-vet.