

FERNANDO ROCHA DOS SANTOS

NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO E EXPRESSÃO DA ÓXIDO  
NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL NO BAÇO DE CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Vale do Rio Doce, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Imunopatologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Orientador:

Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias  
NpIMUNO/UNIVALE

Co-Orientadores:

Dr. Alexandre Barbosa Reis  
Dra. Cláudia Carneiro Martins  
NUPEB/ICEB/UFOP.

Governador Valadares

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDO ROCHA DOS SANTOS

NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO E EXPRESSÃO DA ÓXIDO  
NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL NO BAÇO DE CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Vale do Rio Doce, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Imunopatologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias).

Governador Valadares, 08 de Julho de 2008.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias  
Universidade Vale do Rio Doce

---

Prof. Dr. Wanderson Geraldo Lima  
Universidade Federal de Ouro Preto

---

Profa. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal  
Centro de Pesquisas René Rachou

Dedico este trabalho aos meus filhos Rhuan e Myrna. Espero que se inspirem no meu esforço, determinação e perseverança e avancem mais do que eu avancei no conhecimento científico. Lembrando que buscar com humildade o conhecimento, principalmente das verdades internas, nos aproximará do Criador.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, Dr. Alexandre Barbosa Reis e Dra Cláudia Martins Carneiro pela paciência ao me ensinarem a raciocinar ciência. Agradeço por irem além da ciência e transmitirem afeto em muitos momentos.

À Me Paula Melo Abreu Vieira por me auxiliar nos experimentos de imuno-histoquímica e na análise de imagens com dedicação, paciência e humildade.

À Cristiane, minha esposa, pelo carinho nos momentos importantes e decisivos de minha vida, aos meus filhos por compreenderem minhas ausências, mesmo quando eu estava fisicamente presente, à Rosely, minha irmã, pelo apoio e ao Breno, meu sobrinho, pelo suporte digital.

À Técnica Maria Amélia Gonçalves e aos Bioquímicos Ana Eliete da Conceição Teles e Valdiney J. Oliveira por me substituírem no trabalho.

A todos do NUPEB/ICEB/UFOP que de alguma forma me ajudaram, especialmente à Técnica Maria Chaves do Laboratório de Imunopatologia, por seu apoio nas técnicas de histologia principalmente na microtomia dos tecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e UNIVALE pela bolsa de estudos. À Prefeitura Municipal de Itaipé pelo apoio.

Ao Deus-Criador por tudo que me permitiu aprender nessa caminhada...

“Deus tem seu altar no seio da criação, e o tem também em cada coração humano. No primeiro oficiam as potências cósmicas; no segundo, a consciência individual.”

Carlos Bernardo Gonzáles Pecotche  
(Raumsol) – O Espírito

## RESUMO

Este estudo objetivou avaliar os níveis séricos de óxido nítrico (NO), a expressão esplênica da enzima Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) por método imuno-histoquímico (IHQ) em cães naturalmente infectados (CI) com *Leishmania (L.) chagasi* comparativamente a cães não infectados (CNI), pois o baço é um órgão linfóide relacionado com a defesa inata e adaptativa frequentemente acometido por esta parasitose. Os animais foram agrupados de acordo com a forma clínica em cães assintomáticos (CA), oligossintomáticos (CO) e sintomáticos (CS) e de acordo com a carga parasitária em animais com baixo (BP), médio (MP) e alto parasitismo (AP). Além disso, foram realizadas correlações dos resultados de NO e iNOS com a expressão esplênica das citocinas IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e com imunoglobulinas séricas IgG1, IgG2 e IgG total anti-*Leishmania*. Observou-se maior carga parasitária em CS em relação a CA ( $p < 0,01$ ). A mediana dos níveis séricos de NO dos CI foi significativamente maior quando comparada à mediana dos níveis séricos de NO em CNI ( $p < 0,05$ ). Quando subdivididos de acordo com a forma clínica, a mediana de NO em CS foi significativamente maior que a mediana de NO em CNI ( $p < 0,01$ ). Observou-se também uma correlação positiva das medianas do NO sérico com a densidade parasitária esplênica ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,6444$ ). A análise de correlação mostrou-se positiva entre níveis séricos de NO e expressão esplênica de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,005$ ,  $r = 0,589$ ), com IgG2 ( $p = 0,019$ ,  $r = 0,466$ ) e IgG total ( $p = 0,047$ ,  $r = 0,400$ ). Foram observadas fortes marcações da enzima iNOS em CI e ausência dessa marcação em CNI. Os tipos de marcação imuno-histoquímica foram categorizados como difusa, focal e pontual. Na avaliação semi-quantitativa, as marcações foram mais frequentemente observadas em CS, seguida por CO e CA. Quantitativamente, os resultados da IHQ demonstram que a mediana da expressão de iNOS foi maior em CS ( $p < 0,01$ ) e CO ( $p < 0,05$ ) comparada à mediana em CNI. Estes resultados sugerem que o agravamento clínico está associado à maior expressão de iNOS. A associação entre a expressão da iNOS com a carga parasitária esplênica não apresentou valor significativo ( $p = 0,055$ ), mas observou-se um predomínio de maior expressão de iNOS em cães com alto parasitismo, embora isto não tenha se tornado uma regra. Análises de correlações entre iNOS e citocinas esplênicas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 ou com IgG1, IgG2 e IgG total não foram significativas ( $p > 0,05$ ). Através deste estudo foi possível sugerir que ocorre um aumento dos níveis de NO com o agravamento clínico e com o aumento da densidade parasitária em Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Conclui-se haver expressão esplênica da enzima iNOS em cães com LVC e sugere-se que a expressão está aumentada com o agravamento clínico. Além disso, os resultados permitem inferir que o NO sérico pode ser usado como ferramenta prognóstica em LVC.

Palavras chave: Leishmaniose Visceral Canina. Óxido nítrico. Óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Citocinas. Imunoglobulinas.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate seric levels of nitric oxide (NO), spleen expression of the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) by immunohistochemistry in dogs naturally infected with *Leishmania (L.) chagasi* (ID) compared to non-infected dogs (NID) because spleen is an organ lymphoid related to innate and adaptive defense affected by the parasite. The animals were grouped according to clinical form in asymptomatic (AD), oligosymptomatic (OD) and symptomatic dogs (SD) and in accordance with the parasite load in animals with low (LP), medium (MP) and high parasitism (HP). Additionally, data from NO and iNOS expression were correlated with the splenic expression of cytokines IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and with sera immunoglobulins IgG1, IgG2 and IgG total anti-*Leishmania*. In SD there was higher parasite load in relation to AD ( $p < 0,01$ ). The median sera levels of NO in ID was significantly higher than the median found in NID ( $p < 0,05$ ). When assessed according to clinical form, the median of SD was significantly higher than the median found in NID ( $p < 0,01$ ). There was also a positive correlation between of median seric NO with splenic parasite density ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,6444$ ). The analysis of correlation showed a positive correlation between seric levels of NO and splenic expression of TNF- $\alpha$  ( $p = 0,005$ ,  $r = 0,589$ ) and IgG2 ( $p = 0,019$ ,  $r = 0,466$ ) and total IgG ( $p = 0,047$ ,  $r = 0,400$ ). Semiquantitatively analysis of the IHC showed higher expression of the enzyme iNOS in ID and lack of expression in NID. The iNOS labeling were categorized as diffuse, focal and punctual. From qualitative point of view, the strongest and prominent labeling was observed in SD, followed by OD and AD. Quantitatively analysis showed expression of iNOS was higher in SD ( $p < 0,01$ ) and OD ( $p < 0,05$ ) compared to NID ( $p = 0,001$ ). These results suggest that the clinical deterioration is associated with increased expression of iNOS. The association between the expression of iNOS with the splenic parasite load was not significant ( $p = 0,055$ ), but there was a tendency of higher expression of iNOS in dogs with high parasitism, although this was not a rule. Analysis of correlation between iNOS and expression splenic cytokines IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  or with immunoglobulins IgG1, IgG2 and IgG total was not significant ( $p > 0,05$ ). These results suggest that seric NO may be associated with the clinical worsening and increased splenic parasite load in Canine Visceral Leishmaniasis (CVL). In conclusion, it was observed the expression of the enzyme iNOS in the spleen in CVL and suggests this expression increase with the clinical worsening of the disease. Also, the results suggest that levels of seric NO may be used as prognostic tool in CVL.

Key words: Canine Visceral Leishmaniasis. Nitric oxide. Inducible nitric oxide synthase (iNOS). Cytokines. Immunoglobulins.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Densidade parasitária esplênica (LDU – “Leishmania Donovan Units”) por forma clínica de leishmaniose visceral canina. Cães assintomáticos (CA; n= 10), cães oligossintomáticos (CO; n= 10) e cães sintomáticos (CS; n= 15). Diferença significativa representada por  $p < 0,01$ ; Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn.....37

Figura 2 - Níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) em cães não infectados (CNI; n=10), comparados a cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* (CI; n=35). Diferenças significativas representadas por ( $p < 0,05$ ); Teste de Mann Whitney.....39

Figura 3 - Níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) de cães não infectados (CNI; n= 10), comparados a cães assintomáticos (CA; n=10), cães oligossintomáticos (CO; n=10) e cães sintomáticos (CS; n=15). Diferenças significativas representadas por ( $p < 0,01$ ); Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn.....40

Figura 4 - Níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) de cães infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI; n=35) subdivididos em animais apresentando baixo parasitismo (BP; LDU entre 0 e 10), médio parasitismo (MP; LDU entre 11 e 250) e alto parasitismo (AP; LDU entre 251 e 2564). Diferenças significativas representadas por  $p < 0,05$  (entre BP e MP) e  $p < 0,001$  (entre BP e AP). Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn. B) Correlação de Spearman entre NO sérico e densidade parasitária esplênica de CI ( $p < 0001$ ,  $r = 0,6444$ ,  $n = 35$ ).....41

Figura 5 - Análises de correlação dos níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) em cães infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI, n=21) com expressão esplênica de IL-10 (A;  $p = 0,971$ ), IFN- $\gamma$  (B;  $p = 0,181$ ) e TNF- $\alpha$ . (C;  $p = 0,005$ ,  $r = 0,589$ ). Correlação de Spearman.....42

Figura 6 - Análise Análise de correlação dos níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI; n=24) com níveis séricos de IgG total anti-*Leishmania* (A;  $p = 0,047$ ,  $r = 0,400$ ), IgG1 (B;  $p = 0,964$ ) e IgG2 (C;  $p = 0,019$ ,  $r = 0,466$ ). Correlação de Spearman.....42

Figura 7 - Fotomicrografias de de corte histológico esplênico de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* submetido a reação imuno-histoquímica anti-iNOS. A) Ausência de marcação no grupo controle (CNI); B) Expressão discreta em cão assintomático (CA); C) moderada em cão oligossintomático (CO); D) acentuada em cão sintomático (CS). 600X.....44

Figura 8 - Avaliação quantitativa da expressão de Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) no baço de cães não infectados (CNI) e naturalmente

infectados com *Leishmania (L.) chagasi*. Imuno-histoquímica anti-iNOS..... 47

Figura 9 - Avaliação quantitativa da expressão de Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) no baço de cães não infectados (CNI, n=8) e naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*, classificados por formas clínicas de LVC (CA; n=8, CO; n=8 e CS; n=13). Diferença significativa entre CNI e CO representada por  $p < 0,05$  e entre CNI e CS representada por  $p < 0,01$ . Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn. Imuno-histoquímica anti-iNOS..... 47

Figura 10- Avaliação quantitativa da expressão de Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) no baço de cães não infectados (CNI, n=8) e naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*, classificados por densidade parasitária esplênica (Baixo parasitismo: LDU entre 0 e 10), médio parasitismo: LDU entre 11 e 250 e alto parasitismo: LDU entre 251 e 2564).  $p > 0,05$ . Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn..... 48

Figura 11- Correlação de Spearman da expressão esplênica de iNOS em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI; n=21) com a expressão esplênica de IL-10 (A;  $p = 0,110$ ), IFN- $\gamma$  (B;  $p = 0,697$  e TNF- $\alpha$  (C;  $p = 0,205$ )..... 49

Figura 12- Correlação de Spearman da expressão esplênica de iNOS em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI; n=24) com as imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG total anti-*Leishmania* (A;  $p = 0,076$ ), IgG1 (B;  $p = 0,999$ ), IgG2 (C;  $p = 0,203$ )..... 50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Frequência de graus de parasitismo esplênico associado a formas clínicas em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*.....38
- Tabela 2- Média percentual de marcação da expressão de iNOS por grupo clínico quanto ao tipo e intensidade nos fragmentos esplênicos de cães infectados com *Leishmania (L.) chagasi*.....46

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Complexo Avidina Biotina
AMG	Aminoguanidina
AP	Alto Parasitismo
BP	Baixo Parasitismo
CA	Cães Assintomáticos
CD4 <sup>+</sup>	“Cluster of differentiation” 4 positivo (Grupo de diferenciação)
CD8 <sup>+</sup>	“Cluster of differentiation” 8 positivo (Grupo de diferenciação)
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CI	Cães naturalmente infectados
CNI	Cães Não Infectados
cNOS	Óxido Nítrico Sintase constitutiva
CO	Cães Oligossintomáticos
CS	Cães Sintomáticos
DAB	Diaminobenzidina
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
HE	Hematoxilina Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL-10	Interleucina 10
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
LDU	“Leishman Donovan Units”
LPG	Lipofosfoglicanos
LPS	Lipopolissacárides
LT	Leishmaniose Tegumentar
LT- $\alpha 1\beta 2$	Linfotoxina- $\alpha 1\beta 2$
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucléico mensageiro
NK	Células “natural killer”
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
NO	Óxido Nítrico

PALM	Bainha linfóide peri-arteriolar
PALMS	Bainhas linfóides peri-arteriulares
PB	Polpa Branca
PBS	“Phosphate Buffered Saline” (Solução salina tamponada com fosfato)
PV	Polpa Vermelha
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
SRD	Sem Raça Definida
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante beta
Th1	Linfócitos T “helper” tipo 1
Th2	Linfócitos T “helper” tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
ZM	Zona marginal

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES.....	15
1.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANIA.....	17
1.3 ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA LVC.....	18
1.4 BAÇO: ESTRUTURA E FUNÇÃO.....	21
1.5 BIOLOGIA DO ÓXIDO NÍTRICO: SUA PARTICIPAÇÃO NA RESPOSTA IMUNE.....	23
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
2.2.1 Determinar a carga parasitária no baço de cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> portadores de diferentes formas clínicas de leishmaniose e definir os graus de parasitismo esplênico.....	30
2.2.2 Determinar os níveis do óxido nítrico sérico de cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> e associar os resultados com as formas clínicas e graus de parasitismo esplênico.....	30
2.2.3 Avaliar a expressão da enzima iNOS em baço de cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> e associar os resultados com as formas clínicas e graus de parasitismo esplênico.....	30
2.2.4 Associar os perfis de expressão de iNOS em baço e os níveis de NO séricos com a produção das citocinas INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-10.....	30
2.2.5 Associar os perfis de expressão de iNOS em tecido esplênico e os níveis séricos de NO com os níveis de IgG1, IgG2 e IgG total anti- <i>Leishmania</i> .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 ANIMAIS.....	31
3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	32
3.3 ANÁLISE PARASITOLÓGICA.....	32
3.4 QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE NO.....	33
3.5 REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE INOS..	34
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA.....	37
4.1.1 Carga parasitária por forma clínica.....	37
4.1.2 Categorização por graus de parasitismo esplênico.....	38
4.2 NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO.....	38
4.2.1 Dosagem de NO sérico em cães não infectados comparados a cães infectados.....	39
4.2.2 Determinação dos níveis séricos de NO comparada por carga parasitária.....	40
4.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE NO COM EXPRESSÃO ESPLÊNICA DE IL-10, IFN- $\gamma$ E TNF- $\alpha$ E COM OS NÍVEIS SÉRICOS DE IgG1, IgG2 E IgG TOTAL ANTI- <i>LEISHMANIA</i> ..	41
4.4 EXPRESSÃO ESPLÊNICA DE iNOS.....	43
4.4.1 Análise semi-quantitativa de iNOS.....	43
4.4.1.1 Marcação Difusa (MD).....	45

4.4.1.2	Marcação Focal (MF).....	45
4.4.1.3	Marcação Pontual (MP).....	45
<b>4.4.2</b>	<b>Análise quantitativa de iNOS.....</b>	<b>46</b>
4.4.2.1	Expressão esplênica de iNOS comparados por forma clínica.....	46
4.4.2.2	Expressão esplênica de iNOS comparada por carga parasitária..	48
4.4.2.3	Análise de correlação entre a expressão da iNOS com níveis esplênicos de IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ e com níveis de IgG1, IgG2 e IgG total anti- <i>Leishmania</i> .....	48
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As Leishmanioses são um conjunto de doenças em sua maioria zoonoses causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (LAINSON *et al.*, 1987). O gênero *Leishmania* foi descrito pela primeira vez por Ross em 1903, agrupando espécies de protozoários unicelulares, digenéticos que habitam o trato digestivo de hospedeiros invertebrados em suas formas flageladas (promastigota e paramastigota). Estes parasitos também infectam células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) de vertebrados em sua forma sem flagelos exteriorizados (amastigota). A transmissão ocorre pela picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, que tem sido registrada em ambientes rurais e urbanos, próximos a animais domésticos e habitações humanas (MARZOCHI *et al.*, 1985; LAINSON *et al.*, 1987; LAINSON & RANGEL, 2005; SILVA *et al.*, 2007).

A forma infectante, promastigota metacíclica, presente no inseto vetor é a inoculada na derme junto à saliva durante o repasto sanguíneo. Com base no desenvolvimento das formas promastigotas no tubo digestivo do inseto vetor, LAINSON & SHAW (1988) propuseram um agrupamento das espécies do gênero *Leishmania* em dois subgêneros: parasitos que têm seu desenvolvimento limitado ao estômago do vetor (suprapilária) pertencem ao subgênero *Leishmania*, enquanto os parasitos que se aderem às paredes do piloro ou íleo através do flagelo (Peripilária) pertencem ao subgênero *Viannia*.

As leishmanioses podem ser divididas em dois grupos clínicos: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV).

As diferentes manifestações clínicas das leishmanioses estão envolvidas com a espécie do parasito, espécie do vetor e estado imune do hospedeiro dentre outros aspectos (MARZOCHI *et al.*, 1985).



A LT pode se manifestar em diversas formas clínicas tais como: cutânea, cutânea mucosa, e cutânea difusa (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A LV humana, também chamada de calazar, também manifesta-se em diferentes formas clínicas, variando desde a forma clínica assintomática ou sub-clínica, até as formas clínicas (aguda e crônica) (BADARO *et al.*, 1986).

A LV é uma doença de caráter crônico que atinge órgãos internos, principalmente o fígado, baço, medula óssea e linfonodos. A infecção pode ser assintomática ou pode evoluir apresentado febre recorrente e mal-estar seguido de progressiva piora, anemia e hepato-esplenomegalia, linfadenopatia, leucopenia, perda de apetite, fadiga e estado de debilidade progressivo. Se não tratada leva à morte dentro de 2 a 3 anos (MALLA & MAHAJAN, 2006).

O agente etiológico da LV no velho mundo (Índia e leste da África) é a *Leishmania (L.) donovani*; na China, Ásia Central, sudeste da Europa e Mediterrâneo é a *Leishmania (L.) infantum* e no Novo Mundo (América Latina) é a *Leishmania (L.) chagasi* (LAINSON, 1970; LAINSON & SHAW, 1972).

Correntemente as leishmanioses afetam 12 milhões de indivíduos em todo mundo com ocorrência aproximada de 500.000 novos casos de LV por ano. Cinco países lideram a prevalência da doença: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (ENGWERDA *et al.*, 2004). Com a expansão da AIDS, pacientes co-infectados com *Leishmania* e HIV já são notificados, o que ocasiona aumento nos distúrbios imunológicos, uma vez que a infecção pelo HIV leva à depleção de células T CD4<sup>+</sup>, favorecendo o desenvolvimento de formas graves de leishmanioses, ou por outro lado levam ao aumento da replicação do vírus (DESJEUX & ALVAR, 2003; SINHA *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2007).

Nos últimos anos a LV, que era tipicamente circunscrita à zona rural, vem urbanizando-se e atualmente a LV está presente em 19 dos 27 estados brasileiros. Nos anos 90 as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste passaram a contribuir elevando a incidência da LV no Brasil. Nos últimos cinco anos ocorreram 3500 casos novos, a maioria na região

Nordeste. Este processo de expansão e urbanização está ligado à proximidade entre as habitações, alta densidade populacional e à suscetibilidade da população (GONTIJO & MELO, 2004).

Dados da literatura relatam que o aparecimento de casos humanos de leishmaniose é antecedido pelo achado de cães infectados (PALATNIK-DE-SOUZA *et al.*, 2001). No entanto, ainda existem controvérsias sobre esta questão, que justifica a realização de novos estudos, pois a eliminação dos cães soropositivos nas áreas endêmicas não tem impedido o aparecimento de casos humanos, embora baixem a prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (BRAGA *et al.*, 1998). Outros pesquisadores demonstraram a possibilidade de infecção do inseto vetor pelo homem, sugerindo a possibilidade deste funcionar como reservatório da leishmaniose (COSTA *et al.*, 2000). Entretanto, este mecanismo é pouco aceito e contradiz todo o paradigma descrito na literatura durante a década de 50, quando foram definidos os papéis do homem, da raposa e do cão no ciclo epidemiológico da LV no Brasil (DEANE & DEANE, 1954).

## 1.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A LVC assume grande importância no estudo das leishmanioses, pois o cão tem sido responsabilizado como o principal reservatório doméstico da LV, encontrando-se nos inquéritos epidemiológicos de regiões endêmicas, alta incidência de cães infectados. Estes achados ocorrem provavelmente devido a sua susceptibilidade à infecção e principalmente pelo elevado parasitismo cutâneo comumente encontrado, possibilitando a manutenção do ciclo biológico do parasito ao infectar o inseto vetor no ambiente doméstico (DEANE & DEANE, 1954; KEENAN *et al.*, 1984a; ABRANCHES *et al.*, 1991b; BRAGA *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2006b).

Além disto, o intenso parasitismo cutâneo mesmo em cães assintomáticos fortalece sua importância como fonte de infecção para

flebotomíneos (MOLINA *et al.*, 1994). Outro importante aspecto que se deve ressaltar é o fato de que o cão é um excelente modelo experimental para o entendimento da LV humana bem como para testes de drogas e vacinas (MORENO & ALVAR, 2002; ALVAR *et al.*, 2004).

A LVC pode ser categorizada em três distintas formas clínicas:

**Cães Assintomáticos (CA)** – Cães que apresentam apenas sorologia positiva, sem sinais clínicos.

**Cães Oligossintomáticos (CO)** - Observam-se no máximo três sinais clínicos, podendo aparecer isoladamente ou combinados de forma branda e inespecífica: alopecia localizada, moderado emagrecimento, adenopatia, esplenomegalia leve, olhos opacos.

**Cães Sintomáticos (CS)** – Os animais apresentam uma combinação de mais de três sintomas associados. Podem apresentar alopecia local ou generalizada, despigmentação, esfoliação, nódulos, formação de pústulas, lesões cutâneas ulceradas, geralmente no focinho, orelha e extremidades, conjuntivite, irite e uveíte, cerato-conjuntivite, onicogribose, aumento dos linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia e debilidade geral. Outros sinais também podem ocorrer como diarreia, apatia geral, hemorragia intestinal, paresia do trem posterior, bem como emagrecimento progressivo evoluindo para caquexia e óbito (POZIO *et al.*, 1981; TRYPHONAS *et al.*, 1977; MANCIANTI *et al.*, 1988; BARROUIN-MELO *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006a).

### 1.3 ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA LVC

A história natural da LVC é um tópico amplamente investigado por diversos autores ocorrendo uma série de manifestações imunopatológicas, sendo o acúmulo de células fagocíticas mononucleares nos tecidos linfóides uma característica fundamental. Além disto, observa-se hiperplasia celular nos órgãos afetados: fígado, baço, medula óssea, mucosa do intestino delgado e linfonodos (TAFURI *et al.*, 2001; ENGWERDA *et al.*, 2004).

No contexto histopatológico observa-se no fígado de cães naturalmente ou experimentalmente infectados (CI) com *Leishmania (L.) chagasi* reações granulomatosas, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer, das quais muitas se apresentam parasitadas por formas amastigotas. Relata-se também a presença de infiltrado linfohistioplasmocitário acentuado no compartimento hepático. No baço diversos trabalhos na literatura descrevem a reação inflamatória crônica e difusa, podendo ocorrer também a presença de granulomas circundando macrófagos repletos de parasitos (OLIVEIRA *et al.*, 1993; TAFURI *et al.*, 1996) e em modelo murino cita-se a perda da microarquitetura esplênica com o agravamento da LV (ENGWERDA *et al.*, 2004).

Os linfonodos apresentam aumento no tamanho e número dos folículos linfóides, com marcada hiperplasia, hipertrofia medular e macrófagos medulares parasitados, fenômeno este intimamente relacionado com a linfadenopatia freqüentemente observada na LVC (LIMA *et al.*, 2004).

Na medula óssea observam-se formas amastigotas no interior dos macrófagos, podendo ocorrer anemia e trombocitopenia nos animais infectados (TAFURI *et al.*, 2001).

A intensidade do parasitismo no baço, fígado e medula óssea encontra-se associada à forma clínica da doença e acredita-se que a disseminação na pele do animal ocorra após a visceralização do parasito principalmente após sua chegada à medula óssea (GIUNCHETTI *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006a; GIUNCHETTI *et al.*, 2008).

Diversos estudos considerando as diferentes formas clínicas da LVC demonstraram que CA apresentam parasitismo cutâneo sendo, portanto, fonte de infecção aos flebotomíneos, embora CO e CS apresentem maior infectividade (MOLINA *et al.*, 1994; GUARGA *et al.*, 2000; TRAVI *et al.*, 2001).

O quadro bioquímico clássico na LVC avaliado pela eletroforese de proteínas séricas mostra inversão das taxas de albumina/globulina, levando a hipergamaglobulinemia em aproximadamente 70% dos casos. Este quadro é marcante e explica a intensa atividade policlonal de células B, com elevada produção de imunoglobulinas (Ig) originando os

quadros mais graves com desenvolvimento de lesões renais com glomerulonefrite mesangioproliferativa devido à deposição de imunocomplexos no glomérulo de Malpighi (TRYPHONAS *et al.*, 1977; TAFURI *et al.*, 1989; POLI *et al.*, 1991).

Esta intensa atividade policlonal na LVC leva à produção de diversas classes e subclasses de Ig produzidas durante a evolução da doença. Alguns autores admitem que a IgG1 esta relacionada com progressão enquanto outros mostram o contrário (BORJA-CABRERA *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2006c; RODRIGUEZ-CORTES *et al.*, 2007).

REIS *et al.* (2006c) demonstraram que cães naturalmente infectados classificados como oligo e sintomáticos são capazes de produzir altos níveis de anticorpos de diversas classes (IgG, IgM, IgA, IgE), e mostraram uma associação de altos títulos de IgG2 com alta carga parasitária, principalmente na pele e baço. Estes autores também mostraram que o parasitismo de medula óssea e baço está positivamente correlacionado com a gravidade da doença.

Os mecanismos relacionados com a resistência à infecção por *L. chagasi* ainda não estão claros na infecção natural canina. A LVC sintomática tem sido associada com mudanças imunológicas envolvendo células T (PINELLI *et al.*, 1995), estando relacionada com depressão da imunidade celular, conseqüentemente com perda da capacidade de defesa imune, com queda na produção de citocinas do Tipo 1, favorecendo a disseminação e reprodução dos parasitos (ABRANCHES *et al.*, 1998).

Alguns trabalhos mostram associação entre ativação de células produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2 e TNF- $\alpha$  e a forma assintomática da LVC. Por outro lado, observa-se que parasitismo esplênico está associado com maiores níveis de expressão de IL-4 e IL-10 (PINELLI *et al.*, 1995; LAGE *et al.*, 2007) indicando uma provável relação entre esta citocina e a forma clínica da doença.

#### 1.4 BAÇO: ESTRUTURA E FUNÇÃO

O baço é um órgão linfóide secundário complexo e com diversas e importantes funções para o organismo, atuando ativamente no metabolismo do ferro, destruição de hemácias velhas (eritrofagocitose esplênica), além de ser um reservatório de sangue em situações de esforço. Na fase embrionária o baço tem a função hematopoiética, que é parcialmente perdida após o nascimento. Possui regiões compostas por células de defesa responsáveis por fagocitose de organismos estranhos, apresentação de antígenos, produção de anticorpos e células de memória. Sua origem embriológica são as células progenitoras mesodermis (BRENDOLAN *et al.*, 2007).

O baço é circundado por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, que é revestida por epitélio pavimentoso simples. Os septos de tecido conjuntivo penetram no parênquima deste órgão, conduzindo os vasos sanguíneos para o interior. É constituído pela polpa branca (PB) e polpa vermelha (PV). A PB tem um arranjo de bainha cilíndrica circulando a artéria central, composta por três sub-compartimentos: A bainha linfóide peri-arteriolar (PALM), a zona marginal (ZM) e os folículos. A cápsula compõe-se de tecido conectivo, fibroso, fibras elásticas e musculatura lisa. A camada externa da cápsula esplênica é composta de células mesoteliais, que podem não ser evidentes no corte histológico. Da parte interna da cápsula originam-se trabéculas de musculatura lisa e tecido fibro-elástico em direção ao parênquima esplênico, contendo também vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, sendo os vasos linfáticos do tipo eferentes, através dos quais linfócitos migram para os nodos linfáticos esplênicos (CESTA, 2006).

O sangue chega ao baço através da artéria esplênica aferente, que se divide em artérias trabeculares que penetram no parênquima, se ramifica em pequenas arteríolas que entram na PV, onde se tornam arteríolas centrais. Outras arteríolas menores originam capilares da PB. As arteríolas são circundadas por tecido linfóide, formando as PALMS, composta por células T, células dendríticas e células estromais. Os

folículos são formados por células B foliculares, células dendríticas e células estromais, podendo ocorrer expansão clonal de células B, quando ativadas, levando a hipertrofia folicular (ENGWERDA *et al.*, 2004).

A ZM situa-se entre a PB e PV, consistindo num seio revestido por células endoteliais que permite um fluxo rápido e um ponto de entrada de leucócitos na PB. Esta região esplênica é composta por macrófagos metalofínicos marginais, macrófagos da zona marginal, células B e T, sendo especializada em fagocitose de partículas estranhas ao organismo, como protozoários, bactérias e vírus (OLIVER *et al.*, 1997; MARTIN & KEARNEY, 2002; PILLAI *et al.*, 2005).

Os fatores que atuam na migração de linfócitos B, T, células dendríticas no interior esplênico são controlados por citocinas, como a linfotóxina- $\alpha 1\beta 2$  (LT- $\alpha 1\beta 2$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), estes por sua vez controlam a expressão de quimiocina ligante CXC13 (CXCL13), responsável pela atração de linfócitos B aos folículos de células B. A quimiocina ligante CC19 (CCL19) e quimiocina ligante CC 21 (CCL21) atuam dirigindo células T à zona de linfócitos T, conseqüentemente o perfeito funcionamento do baço e a manutenção de sua arquitetura é dependente da harmonia de diversas quimiocinas e do TNF- $\alpha$ , que sofrem alterações na sua produção quando há parasitose esplênica em modelo murino (ENGWERDA *et al.*, 2002).

As respostas adaptativas e inatas podem ser eficientemente montadas no baço, fazendo deste um importante órgão na homeostase imune. Enquanto a PV está restrita à resposta adaptativa, a ZM está envolvida em ambos os tipos de resposta, através de macrófagos e linfócitos, esta é uma região crucial onde patógenos da corrente sanguínea são seqüestrados. Células B e macrófagos da ZM podem formar uma interação entre imunidade inata e adaptativa (MEBIUS *et al.*, 2004).

A PV consiste de sinusóides que formam labirintos através de conjuntos celulares conhecidos como cordões esplênicos ou de Billoth, estes, por sua vez, são formados por fibras reticulares com células reticulares, macrófagos associados e hemácias. São consideradas células reticulares os miofibroblastos que tem a função de contração do órgão.

As fibras reticulares são compostas de colágeno e fibras elásticas, miofibrilas, lâmina basal de células reticulares e fibras nervosas adrenérgicas não mielinizadas (MEBIUS & KRAAL, 2005).

Alguns trabalhos mostram que no baço murino, células T CD4<sup>+</sup> aumentam suas percentagens após a infecção com *Leishmania infantum* superando o número de células T CD8<sup>+</sup> (GOMES-PEREIRA *et al.*, 2004).

Outros experimentos revelaram que o número de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> aumentavam no baço após infecção com *Leishmania infantum*, mostrando que estas participam em conjunto na resposta imune celular contra o parasito (TSAGOZIS *et al.*, 2003).

## 1.5 BIOLOGIA DO ÓXIDO NÍTRICO: SUA PARTICIPAÇÃO NA RESPOSTA IMUNE

A eliminação de microorganismos intracitoplasmáticos ocorre através da produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, sendo um destes produtos o óxido nítrico (NO), uma molécula responsável por numerosos fenômenos fisiológicos (BOGDAN 1997, 2001).

O NO é um gás incolor à temperatura ambiente, pouco solúvel em água, altamente reativo, com meia-vida de 5 a 30 segundos. É sintetizado pela ação da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) sobre o substrato L-arginina, convertendo-a em L-citrulina e liberando NO. Este pode ser excretado através do ar expirado em sua forma inicial ou pelo suor, saliva e fezes em sua forma oxidada nitrito ou nitrato. A excreção principal ocorre pela urina (BAYLIS & VALLANCE, 1998; ELLIS *et al.*, 1998).

Muitos experimentos têm sido feitos para se avaliar a participação do NO ligada ao controle da pressão arterial, neurotransmissão, relaxamento muscular, peristaltismo intestinal, coagulação sanguínea, adesão e agregação plaquetária (ADAMS, 1996; JORES *et al.*, 1992; FAHEY *et al.*, 1996; WALDECK *et al.*, 1998; RADOMSKI *et al.*, 1990;



FAINT *et al.*, 1991; LORENTE *et al.*, 1996), bem como verificar sua participação na biologia de tumores (AMBER *et al.*, 1988; STUEHR & NATHAN, 1989), reações inflamatórias auto-imunes (SINGH *et al.*, 2000), no choque séptico (TRZECIAK *et al.*, 2008) e em doenças inflamatórias (GRABBE & SCHUWARZ, 1998).

A literatura descreve três isoenzimas de Óxido Nítrico Sintases (NOS) presentes no citosol, sendo duas constitutivas (eNOS e nNOS) e uma induzível (iNOS) (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002), estruturalmente semelhantes, mas reguladas de diferentes formas. As cNOS ocorrem em duas isoformas, neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), a nNOS está envolvida com processos homeostáticos como neurotransmissão, peristaltismo e a eNOS com controle imediato da pressão arterial e vasodilatação (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

As cNOS têm peso molecular de 133 kDa apresentando-se nas formas monoméricas, são reguladas por um mecanismo  $Ca^{2+}$ /calmodulina que ativa e inativa as enzimas, estas têm síntese basal e produzem concentrações picomolares de NO. Ao contrário, Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) necessita da  $Ca^{2+}$ /calmodulina apenas para sua ativação, não ocorrendo inativação quando a concentração de cálcio cai. A iNOS é expressa quando há indução da síntese do RNAm por endotoxinas bacterianas, lipopolisacárides (LPS), ou citocinas relacionadas com resposta do Tipo 1, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ . Esta enzima tem peso molecular de 130 kDa e apresenta-se sob a forma de monômero e tetrâmero. A ativação da iNOS leva a concentrações nanomolares de NO (1000 vezes maior que as cNOS) e a ação dessa enzima requer nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), O<sub>2</sub> e heme como cofatores (IGNARRO, 1996; LI & POULOS, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2002).

A localização imuno-histoquímica de iNOS no baço de ratos, induzida por *Propionibacterium acnes* e LPS foi demonstrada em macrófagos, alguns linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, sugerindo assim a expressão da enzima em vários tipos celulares (FÖRSTERMANN & DUN, 1996).

A geração de NO é característica de células do sistema imune tais como: células dendríticas, NK, monócitos, macrófagos, micróglia, células de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos. Além disto, outros tipos celulares como: células endoteliais, epiteliais, células da musculatura lisa, fibroblastos, condrócitos, hepatócitos, células mesangiais e células de Schwann também são potenciais produtoras de NO (MONCADA *et al.*, 1991).

O produto da oxidação do NO gerado pelas células origina nitritos e nitratos (MARLETTA, 1988; MARLETTA *et al.*, 1988; MAYER *et al.*, 1989) e sua atividade antimicrobiana tem sido demonstrada por uma série de experimentos, sendo que há evidências demonstrando que a produção de NO é parte integrante da resposta do hospedeiro à infecção (MACMICKING *et al.*, 1997).

Alta produção de NO por macrófagos depende de L-arginina extracelular em quantidades adequadas (HEVEL & MARLETTA, 1992). Na maioria dos tipos celulares, o transporte da arginina ocorre via sistema catiônico independente do pH e  $\text{Na}^+$ , enquanto a atividade é mediada por uma família de proteínas transportadoras de aminoácidos catiônicos (CAT1, CAT2A, CAT2B) (NICHOLSON *et al.*, 2001). O perfeito funcionamento desse sistema é então necessário para que o sistema de defesa intracelular atue.

A NADPH oxidase e a iNOS são enzimas envolvidas na produção de intermediários do oxigênio e espécies reativas do nitrogênio respectivamente. A fusão dessas moléculas altamente reativas pode gerar peroxinitrito (OONO<sup>-</sup>), S-nitrotiois (RSNO), óxido de nitrogênio III (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), tetróxido de dinitrogênio IV (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) e complexos dinitrosil-ferro (CDNF) (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; PACHER *et al.*, 2007), levando à formação de várias moléculas com poder antimicrobiano.

O NO pode estar relacionado tanto na defesa do hospedeiro (BRANDONISIO *et al.*, 2001; PANARO *et al.*, 2001) e com a virulência de protozoários (HERTZ & MANSFIELD, 1999; GENESTRA *et al.*, 2006a).

Pesquisadores relatam a presença de moléculas protetoras presentes na membrana celular destes parasitos, tais como: glicolípides,

glicoinositolfosfolípidos e lipofosfoglicano (LPG), os últimos com potencial capacidade inibidora de síntese de NO, quando macrófagos ainda não foram ativados pelo IFN- $\gamma$ . Estes estudos relatam que LPG podem inibir a síntese de IL-12 e então bloquear indiretamente a indução da iNOS (LIEW *et al.*, 1997).

A produção de NO e atividade anti-*Leishmania* foi detectada em linhagem de macrófagos caninos infectados após incubação com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 (PINELLI *et al.*, 2000). Outros pesquisadores demonstraram a importância da geração de NO como microbicida, em LVC, usando cultura de células mononucleares do sangue periférico de cães experimentalmente infectados com *L. (L.) chagasi*, nas quais o inibidor específico da iNOS, aminoguanidina (AMG), levou ao aumento da carga parasitária e diminuição dos níveis de NO em sobrenadante de cultura (RODRIGUES *et al.*, 2007).

A importância leishmanicida do NO via iNOS em cultura de macrófagos murinos, também usando inibidores específicos da enzima mostraram que a atividade da iNOS é crucial para controle da persistência da *Leishmania* em hospedeiros imunocompetentes após a resolução da infecção primária. Diversos trabalhos demonstram que a falha em manter iNOS ativa pode levar a uma reativação de infecção latente causada por organismos sensíveis ao NO, durante a fase de imunossupressão (LIEW *et al.*, 1990a; STENGER *et al.*, 1996).

O NO e a sua capacidade leishmanicida em macrófagos de cães vacinados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* apresentaram associação entre a produção de NO induzido por IFN- $\gamma$  (BACELLAR *et al.*, 2000; PANARO *et al.*, 2001). Reforçando a importância do NO como microbicida, demonstrou-se um aumento da expressão de iNOS em cultura de macrófagos caninos infectados com *Leishmania (L.) infantum* estimulados com IFN- $\gamma$ . Naquele estudo, a maior expressão de iNOS levou ao aumento na produção de NO (SISTO *et al.*, 2001).

A iNOS tem sido associada a resistência à infecção por *Leishmania major* em camundongos C57BL/6, nos quais tem sido demonstrada a expressão desta enzima desde o início da infecção na

pele. Contrariamente, macrófagos de camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção, apresentam níveis menores de expressão de iNOS devido à inibição causada por TGF- $\beta$  e diminuição da resposta ao IFN- $\gamma$  (STENGER *et al.*, 1994; BOGDAN, 1997; 2001).

GANTT *et al.*, (2003) avaliando os mecanismos de defesa das leishmanias “in vitro” mostraram que estas podem liberar protease catepsina B, capazes de ativar TGF- $\beta$  latente e assim ativar a arginase. O TGF- $\beta$  atuaria de forma a prolongar o parasitismo, inibindo o sistema de defesa dos macrófagos e desta forma diminuindo a produção de NO.

Relata-se que a polarização da resposta Tipo 1 (Th1) é eficiente na geração de NO e está associada com doenças inflamatórias e eliminação de patógenos intracelulares via iNOS. Em contraste, quando predominam no meio extracelular citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$  ocorre inibição da produção de NO (resposta Tipo 2 ou Th2) (NAGELKERKEN *et al.*, 1993; BACELLAR *et al.*, 2000). Experimentos demonstraram que o predomínio de células do Tipo 2, com aumentada produção de IL-4, caracterizam-se por não serem protetoras contra as leishmanioses, ocorrendo exacerbação dos sintomas (LOHOFF *et al.*, 1997).

Os efetores celulares Th1 e Th2 se originam a partir de células precursoras chamadas Thp. Estas quando são estimuladas pela IL-12 dão origem a células Tipo 1 e quando estimuladas pela IL-4 originam células Tipo 2 (MOSMANN & COFFMAN, 1989). Entretanto, são muitos os fatores que influenciam na polarização para um dos tipos de resposta imune frente a parasitos do gênero *Leishmania* spp. Recentemente foi descrito que além das populações efetoras derivadas de LT auxiliares descritas acima, a existência de células T regulatórias (T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) poderiam favorecer a infecção levando uma modulação da imunidade protetora ao parasito (LIU *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003).

Estudos relataram que cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*, sintomáticos, apresentaram maiores níveis de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  (BELKAID *et al.*, 2001; CORREA *et al.*, 2007), sugerindo que a existência de células regulatórias poderia influenciar a

interação parasito-hospedeiro e desta forma favorecer a manifestação de formas clínicas graves na LVC.

Além da sua participação na imunidade a infecções, o NO pode estar envolvido em processos imunopatológicos, pois sua alta reatividade pode ocasionar danos celulares acarretando um efeito tóxico indesejável no compartimento celular. Há consenso de que o efeito citotóxico do NO ocorre devido à sinergia com o íon superóxido, principalmente pelo subproduto peroxinitrito (ISCHIROPOULOS, 2004; NORMAN & LIEW, 1995). Este produto do NO é também um forte oxidante e pode reagir diretamente com ampla gama de moléculas presentes no meio celular, principalmente os grupos ricos em elétrons, sua meia vida é curta (~10 – 20 ms), mas suficiente para cruzar a membrana celular, difundindo-se uma a duas células de diâmetro (DENICOLA *et al.*, 1998). Seus principais alvos são proteínas, sendo inclusive capaz de inativar a iNOS por modificação oxidativa de seu grupo heme (HUHMER *et al.*, 1997), aminoácidos, principalmente oxidação das cisteínas (SHIBATA *et al.*, 1996) e por mecanismos indiretos de reações químicas leva a nitração de tirosinas, afetando a estrutura e função protéica, resultando na geração de epitopos antigênicos, mudança na atividade de enzimas, alterada organização do cito-esqueleto e alterações importantes na transdução de sinais (SCHOPFER *et al.*, 2003). Já se demonstrou seu potencial oxidativo também sobre os aminoácidos triptofano, metionina e histidina, além de reagir com lipídios e ácidos nucléicos (PACHER *et al.*, 2007).

Evidências estão se acumulando no sentido de admitir que o NO contribua para algumas condições patológicas como asma, artrite reumatóide, lesões ateroscleróticas, tuberculose, esclerose múltipla, Alzheimer e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (DUSSE *et al.*, 2003).

A avaliação da expressão da enzima iNOS em tecido esplênico de cães naturalmente infectados *Leishmania (L.) chagasi*, bem como a quantificação sérica de NO é um tópico pouco investigado. Além disso, a associação entre esses biomarcadores, as diferentes formas clínicas, os graus de parasitismo esplênico e suas correlações com o perfil de

citocinas e subclasses de anticorpos pode auxiliar no entendimento da imunopatogênese da LVC. Neste sentido, o presente trabalho, buscou fornecer informações adicionais à elucidação do complexo mecanismo de interação parasito-hospedeiro na LVC considerando o compartimento esplênico como um importante órgão linfóide atingido pelo parasito.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar níveis séricos de NO e a expressão da enzima iNOS no baço com perfil de citocinas e subclasses de Ig de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, apresentando diferentes formas clínicas e graus de parasitismo esplênico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar a carga parasitária no baço de cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* portadores de diferentes formas clínicas de leishmaniose e definir os graus de parasitismo esplênico

2.2.2 Determinar os níveis do óxido nítrico sérico de cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* e associar os resultados com as formas clínicas e graus de parasitismo esplênico.

2.2.3 Avaliar a expressão da enzima iNOS em baço de cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* e associar os resultados com as formas clínicas e graus de parasitismo esplênico.

2.2.4 Associar os perfis de expressão de iNOS em baço e os níveis de NO séricos com a produção das citocinas INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10.

2.2.5 Associar os perfis de expressão de iNOS em tecido esplênico e os níveis séricos de NO com os níveis de IgG1, IgG2 e IgG total anti-*Leishmania*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo é fruto de uma colaboração entre o Núcleo de Pesquisa em Imunologia da UNIVALE e o Laboratório de Imunopatologia do NUPEB/UFOP.

O banco de dados disponível para citocinas e anticorpos destes animais possibilitou análises de correlações entre os níveis séricos de NO e expressão esplênica de iNOS com a expressão esplênica de IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e níveis séricos de IgG1, IgG2 e IgG total anti-*Leishmania*.

#### 3.1 ANIMAIS

Soro e fragmentos de baço de 35 cães sem raça definida (SRD) de ambos os sexos, com idade estimada entre 2 a 6 anos, procedentes do centro de controle de zoonoses (CCZ) de Belo Horizonte – MG, foram selecionados para este estudo. O uso experimental destes foi aprovado pelo comitê de ética da UFMG (CETEA). Os animais haviam sido previamente tratados com anti-helmínticos de largo espectro (Endal plus®) e imunizados contra parvovirose, leptospirose, parainfluenza e hepatite (Pfizer®). Os cães inseridos neste estudo apresentavam testes sorológicos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA positivos (CI).

Dez cães com títulos inferiores a 1:40 (RIFI), exames parasitológicos negativos e clinicamente sadios foram considerados não infectados e incluídos no grupo controle (CNI).



### 3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os cães soropositivos por RIFI foram clinicamente classificados de acordo com presença ou ausência de sinais clínicos em: Assintomático (CA, n=10), quando não havia sinais ou sintomas da doença; Oligossintomático (CO, n=10), com no máximo três sinais clínicos incluindo córnea opaca e/ou alopecia e/ou moderada perda de peso; Sintomático (CS, n=15), apresentando sinais clínicos de leishmaniose visceral, com córneas opacas, severa perda de peso, onicogribose, lesões cutâneas, apatia e cerato-conjuntivite. A avaliação clínica fora realizada por um médico veterinário treinado em LVC.

### 3.3 ANÁLISE PARASITOLÓGICA

Após necropsia, amostras do baço dos cães soropositivos foram submetidas a exames parasitológicos para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* por meio de esfregaços e classificados de acordo com a carga parasitária. Neste trabalho foi usado o índice de carga parasitária obtido pela análise do tecido esplênico.

Amostras do baço foram coletadas e impressões foram realizadas em duas lâminas microscópicas que após secas ao ar foram fixadas em metanol, coradas com *Giemsa* e examinadas ao microscópio óptico. Foi contado o número de formas amastigotas por 1000 células nucleadas e os resultados expressos como “Leishman Donovan Units” (LDU) de acordo com STAUBER (1955) modificado por REIS *et al.* (2006 a,b,c).

O parasitismo esplênico foi categorizado como baixo (BP), médio (MP) e alto parasitismo (AP) conforme os valores de LDU estatisticamente categorizados em tercis da seguinte forma: BP (0 – 10), MP (11– 250) e AP (251 – 2564) de acordo com LAGE *et al.* (2007).

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE NO

A avaliação da concentração de NO sérico foi realizada pela medida de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), de acordo com a reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982; GUTMAN & HOLLYWOOD, 1992). Os soros dos cães foram codificados antes da realização da dosagem e decodificados após, com posterior análise dos dados obtidos.

Para avaliação dos níveis séricos de NO, a 100  $\mu\text{L}$  de soro de cada cão diluído 1:4 em água destilada foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de nitrato redutase (1U/mL) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 10  $\mu\text{L}$  de NADPH (6mM) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e 10  $\mu\text{L}$  de FAD (200 mM) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Este procedimento foi necessário para reduzir nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Após um período de incubação por 12 horas a 37°C, as amostras foram submetidas ao tratamento com 1/20 de sulfato de zinco (300g/L) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Subseqüentemente, as amostras foram centrifugadas a 10000g por 15 minutos. Após centrifugação, 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram adicionadas em duplicata em placas de 96 poços de fundo plano. Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess (0.1% naphthylethyldiamine dihydrochloride, 1% sulphanylamide, 5% phosphoric acid) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) às amostras processadas de soro. Após incubação em câmara escura por 10 minutos, as amostras foram submetidas ao leitor automático de microplacas e a absorbância foi avaliada no comprimento de onda de 570 nm. A concentração de nitrito das amostras foi determinada pela extrapolação da curva-padrão de diluição da solução de nitrito de sódio (com variação linear de 0,78-100  $\mu\text{mol/L}$ ) possibilitando a identificação de valores de cada amostra. Os resultados (em  $\mu\text{M}$ ) foram expressos como média da concentração de NO sérico.

### 3.5 REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE INOS

Cortes histológicos processados e parafinizados foram submetidos à microtomia para a obtenção de 2 cortes com espessura de 4  $\mu\text{m}$  e estes foram fixados em lâminas gelatinizadas. A seguir, os cortes foram desparafinizados em xilol (dois banhos de 15 minutos cada), hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) em banhos de 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e então se procedeu ao bloqueio da peroxidase endógena (180ml de álcool metílico/20mL de peróxido de hidrogênio 30%) por 30 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem em PBS com três banhos de 5 minutos cada.

Para a recuperação antigênica foi utilizado o tampão citrato pH 6.0 em forno de microondas por 10 minutos. Depois de retiradas do forno de microondas, os cortes foram deixados à temperatura ambiente para ocorrer um resfriamento progressivo dos mesmos ainda imersos no tampão citrato pH 6.0. Só então foram lavados em PBS, em três banhos de 5 minutos cada.

Após a secagem das bordas dos cortes com papel absorvente, aplicou-se o soro normal de cavalo (R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC; Vector Laboratories, Inc.) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C, com o objetivo de bloquear sítios inespecíficos. Em seguida, secou-se o excesso de soro normal de cavalo e os cortes foram incubados por 18 horas em câmara úmida a 4°C com o anticorpo policlonal IGG de coelho anti-iNOS (Rabbit anti-Mouse iNOS, SC-651, Santa Cruz Biotechnology, INC.) diluído 1:200 em solução diluente de anticorpo com componentes redutores de “*background*” (DakoCytomation, USA).

Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário biotilado (R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC; Vector Laboratories, Inc.) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Seguiram-se três banhos de 5 minutos cada, em PBS. Os cortes foram então incubados com o complexo ABC (R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC; Vector Laboratories, Inc.) por 30 minutos em

câmara úmida a 37°C. Seguiu-se a lavagem em PBS, três banhos de 5 minutos cada. A revelação da reação da peroxidase foi obtida através da incubação em solução de DAB (50mg de diaminobenzidina em 250 mL de PBS e 500 µL de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante 5 minutos. No intuito de interromper a revelação, os cortes foram lavados em água corrente por cinco minutos.

Para realizar a contra-coloração, foi utilizado Hematoxilina de Harris por 10 segundos à temperatura ambiente seguida pela lavagem dos cortes por 5 minutos em água corrente. O material foi desidratado em álcool 100% e seco em estufa 56°C. Após a secagem as lâminas foram montadas com resina (Pró-Cito) e lamínula.

Como controle da reação foram incluídos cortes de pele obtidos de cão inoculado com antígeno de *Leishmania (Viannia) brasiliensis* e saponina, que já havia mostrado alta expressão de iNOS, durante a fase de padronização da reação imuno-histoquímica. Como controle negativo, omitiu-se o anticorpo anti-iNOS, que foi substituído por PBS em uma lâmina. Os tecidos assim obtidos foram utilizados para analisar a expressão de iNOS no baço. Este experimento foi realizado em duplicata em dias diferentes e em cada bateria havia 1 controle positivo e 1 controle negativo. As lâminas foram submetidas à análise qualitativa usando-se microscópio óptico e posteriormente à análise quantitativa da expressão de iNOS através de microscópio Leica DM 5000/Leica CTR 5000, processadas com o auxílio do software Leica Qwin Plus, analisando-se 20 campos aleatórios de cada lâmina e os resultados expressos em  $\mu\text{m}^2$ . Seqüencialmente os diferentes grupos clínicos foram associados aos resultados de expressão de iNOS.

Foram utilizados diferentes parâmetros na observação da expressão da iNOS, a saber: difusa (quando a marcação ocorria em toda extensão do campo microscópio analisado), focal (quando os focos de marcação ficavam delimitados em áreas bem definidas) e pontual (quando células marcadas isoladamente eram observadas).

### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Realizaram-se análises estatísticas utilizando-se testes específicos para comparar os resultados das dosagens de NO em soro e expressão de iNOS esplênica com o apoio instrumental do software PRISM 4.0 adotando-se nível de significância a 5%. Os dados foram submetidos aos testes não paramétricos. Para análise da carga parasitária por grupos clínicos, dos níveis séricos de NO por grupos clínicos, níveis séricos de NO por carga parasitária, avaliação quantitativa de iNOS por grupos clínicos e avaliação quantitativa de iNOS por carga parasitária foi usado o teste de Kruskal Wallis. Os diferentes graus de parasitismo esplênico foram estimados por tercis. Para análise dos níveis de NO entre animais infectados e não infectados usou-se o teste de Mann-Whitney. Para análises de correlação entre níveis séricos de NO e perfil sérico de Ig, correlação entre níveis séricos de NO e densidade parasitária esplênica, correlação entre níveis séricos de NO e perfil de citocinas esplênicas, correlação entre expressão esplênica de iNOS e perfil sérico de Ig e correlação entre expressão esplênica de iNOS e perfil de citocinas esplênicas usou-se correlação de Spearman.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

#### 4.1.1 Carga parasitária por forma clínica

A carga parasitária esplênica dos diferentes grupos clínicos de cães categorizados em CA, CO e CS apresentou mediana de LDU iguais a 2, 20 e 298 respectivamente, havendo diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,01$ ). Verificou-se aumento da carga parasitária associada à maior gravidade da LVC, como demonstrado na Figura 1.

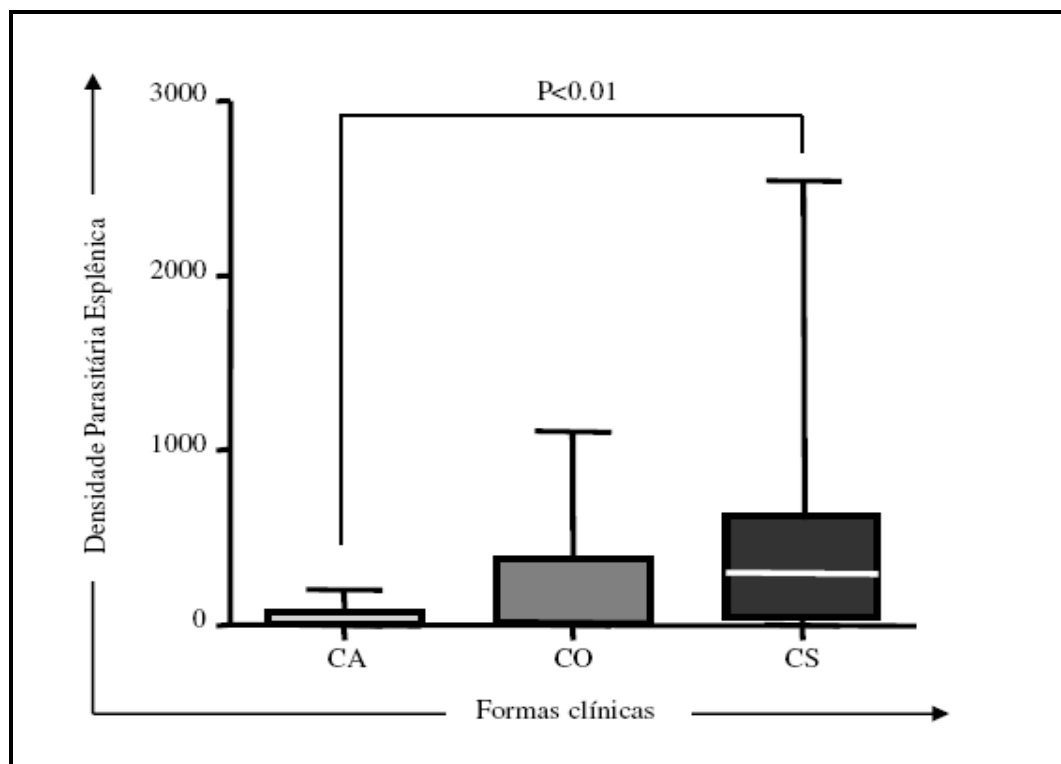


Figura 1- Densidade parasitária esplênica (LDU - “Leishmania Donovan Units”) por forma clínica de leishmaniose visceral canina. Cães assintomáticos (CA; n= 10), cães oligossintomáticos (CO; n= 10) e cães sintomáticos (CS; n= 15). Diferença significativa representada por  $p < 0,01$ ; Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn.

#### 4.1.2 Categorização por graus de parasitismo esplênico

O parasitismo esplênico foi categorizado como baixo (BP), médio (MP) e alto parasitismo (AP) conforme os valores de LDU estatisticamente categorizados em tercís da seguinte forma: BP (0 – 10), MP (11– 250) e AP (251 – 2564). Esta classificação permitiu estimar o percentual de grau parasitismo por grupo clínico. Foi observado que o grupo CS apresentava 53,3% de AP, 33,3% de MP e apenas 13,3% de BP; O grupo CO apresentava 20% de AP, 50% de MP e 30% de BP; Enquanto o grupo CA apresentava 30% de MP e 70% de BP (Tabela 1).

Tabela 1- Frequência de graus de parasitismo esplênico associado a formas clínicas em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*

GRAU DE PARASITISMO	FORMAS CLÍNICAS		
	CA%	CO%	CS%
BP (n=12)	70	30	13,3
MP (n=13)	30	50	33,3
AP (n=10)	0	20	53,3
<b>Total %</b>	100	100	100

CA – Cães assintomáticos; CO – Cães oligossintomáticos; CS – Cães sintomáticos; BP – Baixo parasitismo; MP- Médio parasitismo; AP – Alto parasitismo. (n=35).

#### 4.2 NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO

A determinação dos níveis séricos de óxido nítrico foi realizada de acordo com a redução de nitratos a nitritos, estes revelados pela reação de Griess e os resultados associados às formas clínicas dos cães, bem como ao grau de parasitismo esplênico.

#### 4.2.1 Dosagem de NO sérico em cães não infectados comparados a cães infectados

Os níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) foram determinados em CNI e CI apresentando diferentes formas clínicas da leishmaniose. CI apresentaram maiores níveis séricos de NO quando comparados a CNI, apresentando medianas 14,92 e 4,44  $\mu\text{M}$  respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 2). Entretanto, quando os valores de NO de CI foram separados de acordo com a forma clínica observou-se diferença significativa apenas entre CS e CNI, sendo as medianas de CA, CO e CS respectivamente 5,42; 3,95 e 23,75  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 3).

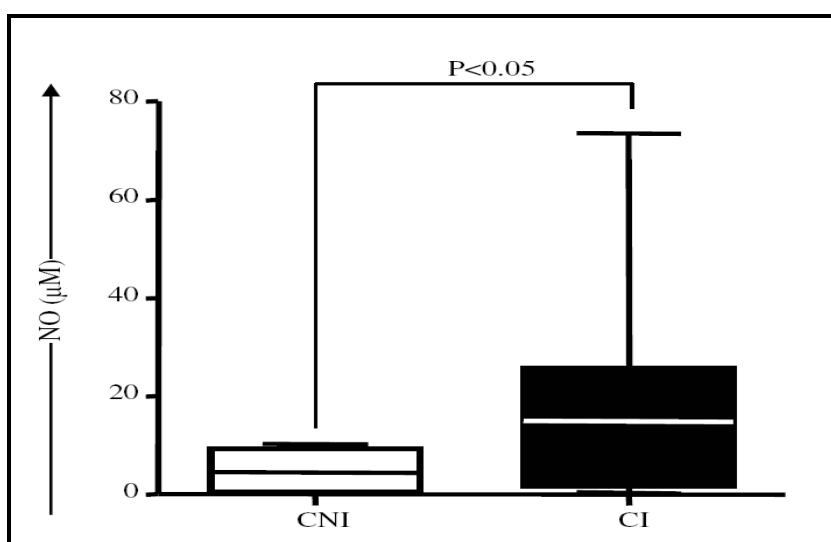


Figura 2 – Níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) em cães não infectados (CNI; n=10), comparados a cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* (CI; n=35). Diferenças significativas representadas por ( $p < 0,05$ ); Teste de Mann Whitney.



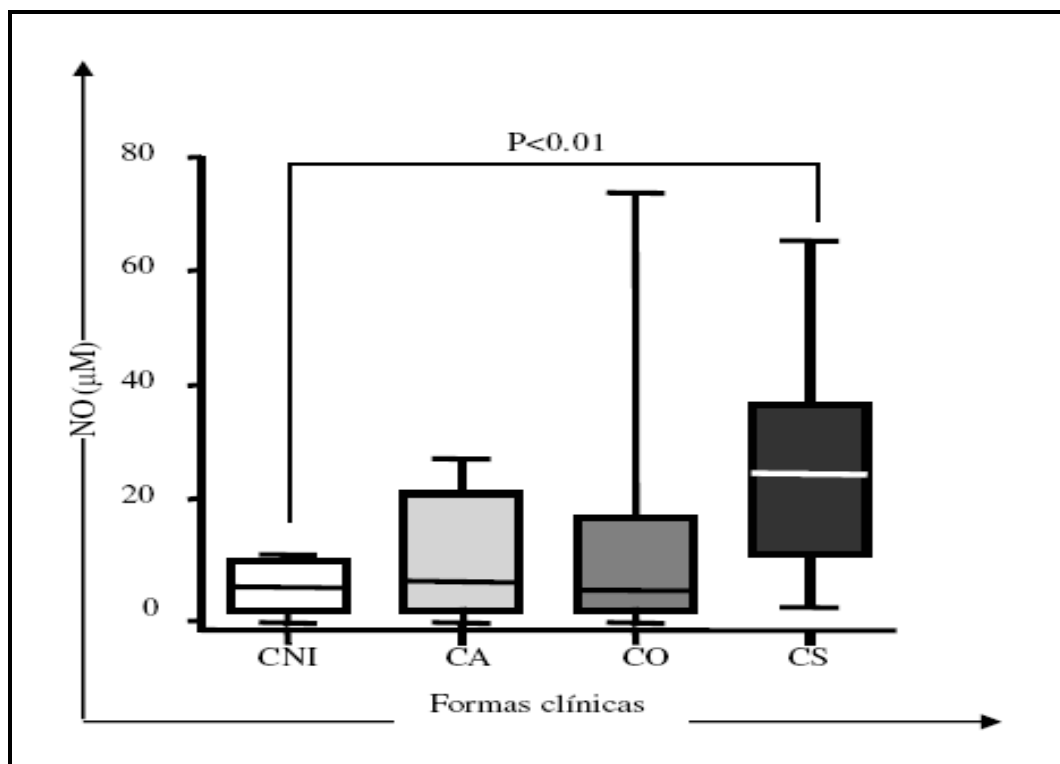


Figura 3 - Níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) de cães não infectados (CNI; n= 10), comparados a cães assintomáticos (CA; n=10), cães oligossintomáticos (CO; n=10) e cães sintomáticos (CS; n=15). Diferenças significativas representadas por ( $p < 0,01$ ); Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn.

#### 4.2.2 Determinação dos níveis séricos de NO comparada por carga parasitária

Foram avaliados também os níveis séricos de NO de acordo com o grau de parasitismo esplênico. Observa-se que a mediana de NO do grupo com BP ( $1,49 \mu\text{M}$ ) é significativamente menor que a mediana dos grupos com MP ( $18,84 \mu\text{M}$ ) e AP ( $26,37 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 4A). Este resultado foi reforçado pela análise de correlação entre estas variáveis que revelaram existir uma forte correlação entre a carga parasitária e os níveis séricos de NO ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,6444$ ) (Figura 4B).

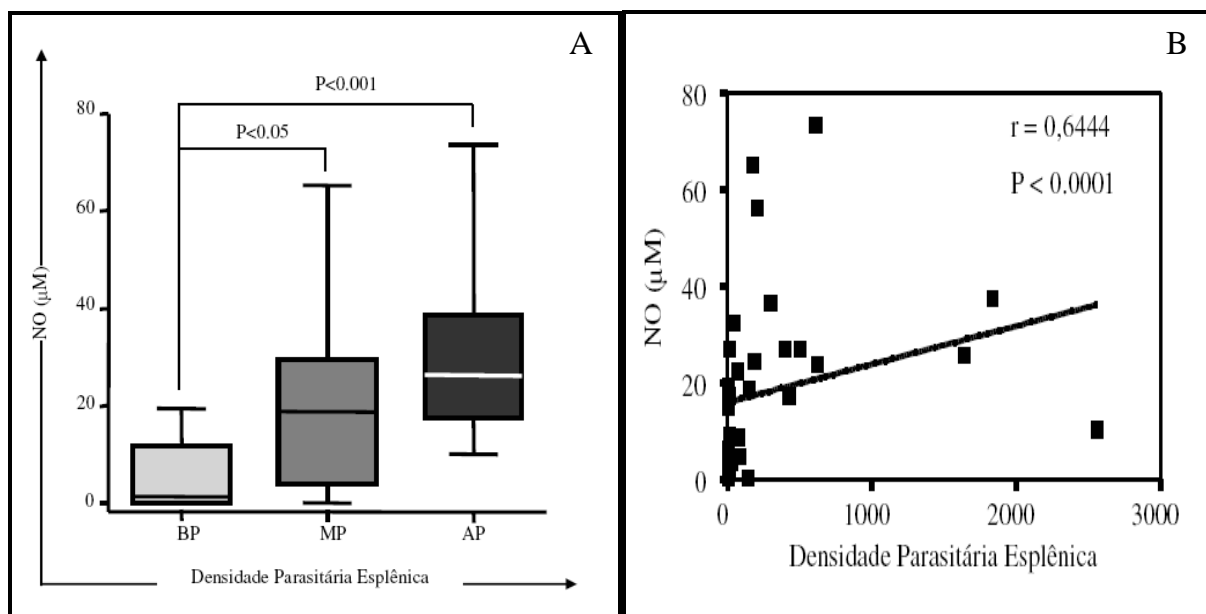


Figura 4 - A) Níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) de cães infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI; n=35) subdivididos em animais apresentando baixo parasitismo (BP; LDU entre 0 e 10), médio parasitismo (MP; LDU entre 11 e 250) e alto parasitismo (AP; LDU entre 251 e 2564). Diferenças significativas representadas por  $p < 0,05$  (entre BP e MP) e  $p < 0,001$  (entre BP e AP). Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn. B) Correlação de Spearman entre NO sérico e densidade parasitária esplênica de CI ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,6444$ ,  $n = 35$ ).

#### 4.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE NO COM EXPRESSÃO ESPLÊNICA DE IL-10, IFN- $\gamma$ E TNF- $\alpha$ E COM OS NÍVEIS SÉRICOS DE IgG1, IgG2 E IgG TOTAL ANTI-*LEISHMANIA*

Foi realizada análise de correlação entre os níveis séricos de NO com os dados obtidos por densitometria das bandas de RT-PCR (método semi-quantitativo) para IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e com níveis séricos de IgG1, IgG2 e IgG total anti-*Leishmania*.

Observou-se correlação positiva entre os níveis séricos de NO e expressão esplênica de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,005$ ,  $r = 0,589$ ), não se observando correlação ( $p > 0,05$ ) com IFN- $\gamma$  e IL-10 (Figura 5). Também se observou correção positiva entre NO sérico e níveis de IgG Total ( $p = 0,047$ ,  $r = 0,400$ ) e IgG2 ( $p = 0,019$ ,  $r = 0,466$ ), sendo que não houve correlação deste com IgG1 ( $p > 0,05$ ) (Figura 6).

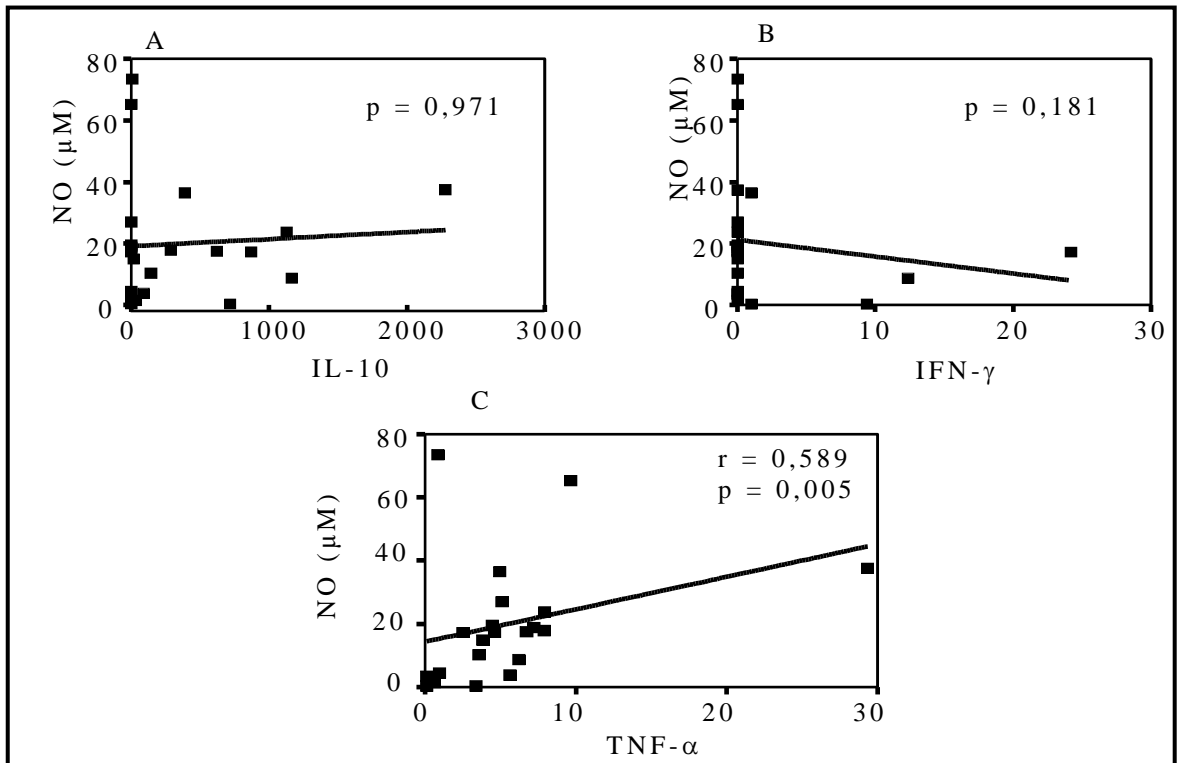


Figura 5 – Análises de correlação dos níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) em cães infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI, n=21) com expressão esplênica de IL-10 (A; p=0,971), IFN- $\gamma$  (B; p=0,181) e TNF- $\alpha$  (C; p=0,005, r=0,589). Correlação de Spearman.

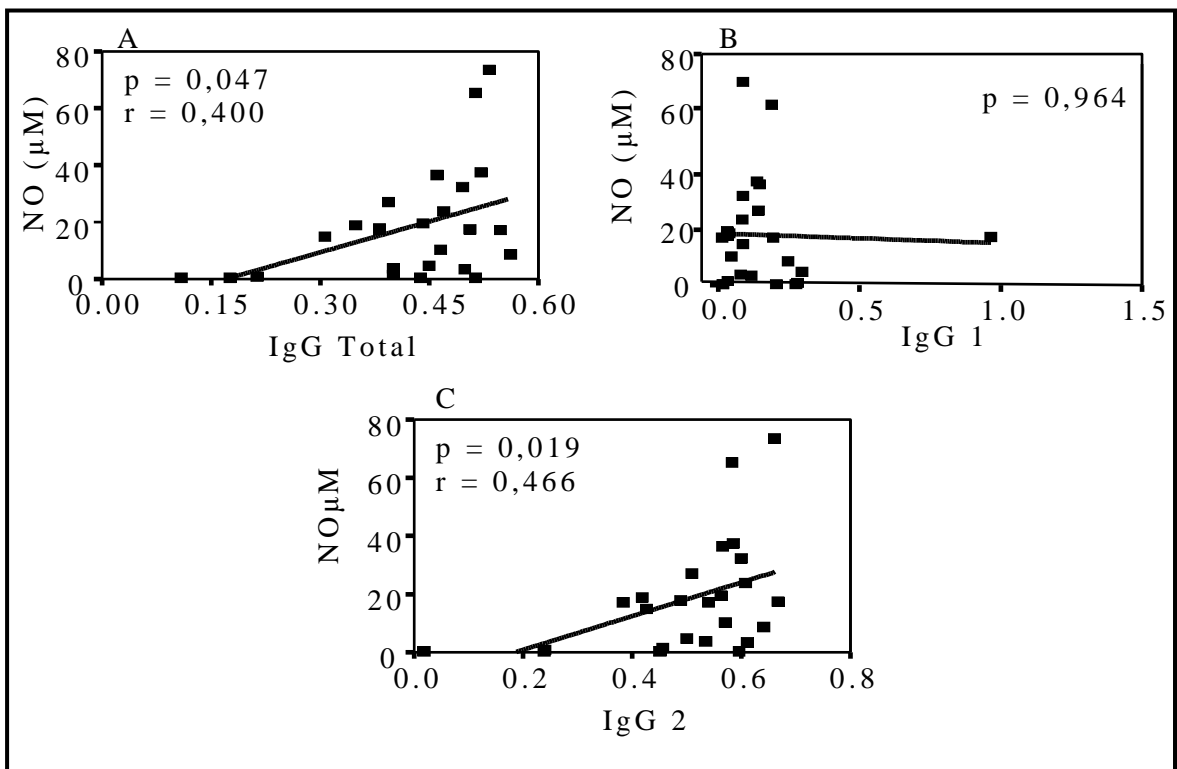


Figura 6 - Análise de correlação dos níveis séricos de NO ( $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ ) de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI; n=24) com níveis séricos de IgG total anti-*Leishmania* (A; p=0,047, r=0,400), IgG1 (B; p=0,964) e IgG2 (C; p=0,019, r=0,466). Correlação de Spearman.

#### 4.4 EXPRESSÃO ESPLÊNICA DE iNOS

##### 4.4.1 Análise semi-quantitativa de iNOS

Cortes histológicos de fragmentos de baço dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* foram submetidos à reação imunohistoquímica investigando-se a expressão da enzima iNOS (Figura 7). Foram utilizados diferentes parâmetros na observação da expressão da iNOS, a saber: difusa (quando a marcação ocorria em toda extensão do campo microscópio analisado), focal (quando os focos de marcação ficavam delimitados em áreas bem definidas) e pontual (quando células marcadas isoladamente eram observadas) (Tabela 2). Observou-se também marcação nas trabéculas e cápsulas, que foi incluída como marcação difusa.

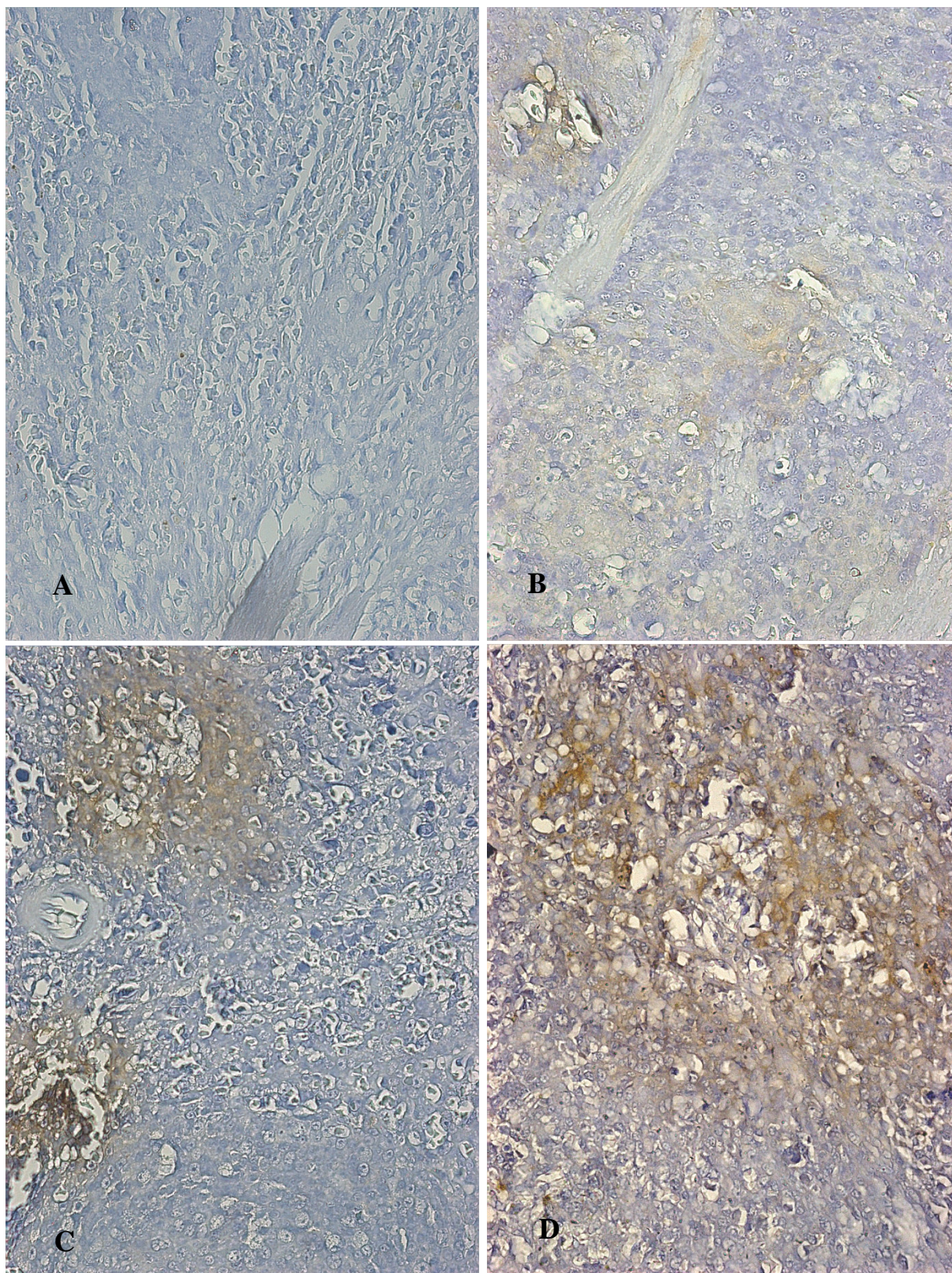


Figura 7 – Fotomicrografias de corte histológico esplênico de cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* submetido a reação imuno-histoquímica anti-iNOS. A) Ausência de marcação no grupo controle (CNI); B) Expressão discreta em cão assintomático (CA); C) moderada em cão oligossintomático (CO); D) acentuada em cão sintomático (CS). 600X.

#### 4.4.1.1 Marcação Difusa (MD)

No grupo CS, 53% dos animais apresentaram marcação difusa acentuada (MDA), 30,8% marcação difusa moderada (MDM) e 16,2% não apresentaram MD. 45% dos CO apresentaram MDA, 18,2% MDM, 18,2% marcação difusa leve (MDL) e 18,6% não apresentaram MD. CA apresentaram MDL em 57,1% dos animais e 42,9% deles não apresentaram MD (Tabela 2).

#### 4.4.1.2 Marcação Focal (MF)

Apresentaram marcação focal acentuada (MFA) 30,8% dos animais do grupo CS, 7,7% marcação focal moderada (MFM), 5,5% marcação focal leve (MFL) e 56% não apresentaram MF. 18,2% de CO apresentaram MFA, 18,2% MFM, 9,1% MFL e 54,5% não apresentavam MF. 14,2% de CA apresentaram MFL e 85,8% não apresentavam MF (Tabela 2).

#### 4.4.1.3 Marcação Pontual (MP)

No grupo CS 7,7% dos animais apresentaram marcação pontual acentuada (MPA), 15,4% marcação pontual moderada (MPM), 15,4% marcação pontual leve (MPL) e 61,5% não apresentaram MP. 9,1% de CO apresentaram MPM, 18,2% MPL e 72,7% não apresentaram MP. 14,3% de CA apresentaram MPM, 14,3% MPL e 71,4% não apresentaram MP (Tabela 2).

Tabela 2 – Média percentual de marcação da expressão de iNOS por grupo clínico quanto ao tipo e intensidade nos fragmentos esplênicos de cães infectados com *Leishmania (L.) chagasi*

Forma clínica	Marcação Difusa				Marcação Focal				Marcação Pontual			
	AUS.	LEVE	MOD.	ACEN.	AUS.	LEVE	MOD.	ACEN.	AUS.	LEVE	MOD.	ACEN.
<b>CA</b> (n=8)	42,9	57,1	0	0	85,8	14,2	0	0	71,4	14,3	14,3	0
<b>CO</b> (n=8)	18,6	18,2	18,2	45	54,5	9,1	18,2	18,2	72,7	18,2	9,1	0
<b>CS</b> (n=13)	16,2	0	30,8	53	56	5,5	7,7	30,8	61,5	15,4	15,4	7,7

CA – Cães assintomáticos; CO – cães oligossintomáticos; CS – Cães Sintomáticos. AUS= ausente, MOD.= moderada; ACEN.= acentuada.

#### 4.4.2 Análise quantitativa de iNOS

##### 4.4.2.1 Expressão esplênica de iNOS comparados por forma clínica

A análise quantitativa de iNOS em fragmentos esplênicos de 8 CNI e 29 CI foi realizada usando o analisador de imagens Leica Qwin Plus fotografando-se aleatoriamente 20 campos microscópicos de cada corte histológico calculando-se a média de dois experimentos. CNI não apresentaram marcação detectável, portanto não foi possível quantificar iNOS neste grupo. A quantificação da expressão da iNOS em CI apresentou grande dispersão dos dados, variando de 0 a 1.051.769  $\mu\text{m}^2$  com mediana 30.561  $\mu\text{m}^2$  (Figura 8). As análises entre as diferentes formas clínicas de CI com CNI mostraram diferença significativa entre CS e CNI ( $p < 0,01$ ) e entre CO e CNI ( $p < 0,05$ ) (Figura 9).

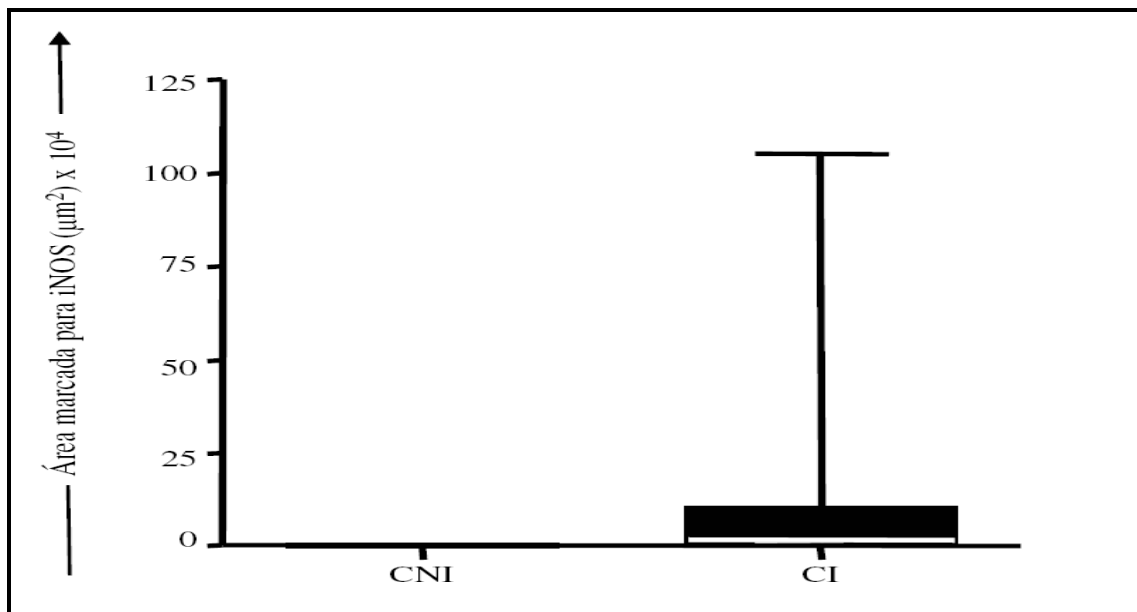


Figura 8 - Avaliação quantitativa da expressão de Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) no baço de cães não infectados (CNI) e naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*. Imuno-histoquímica anti-iNOS.

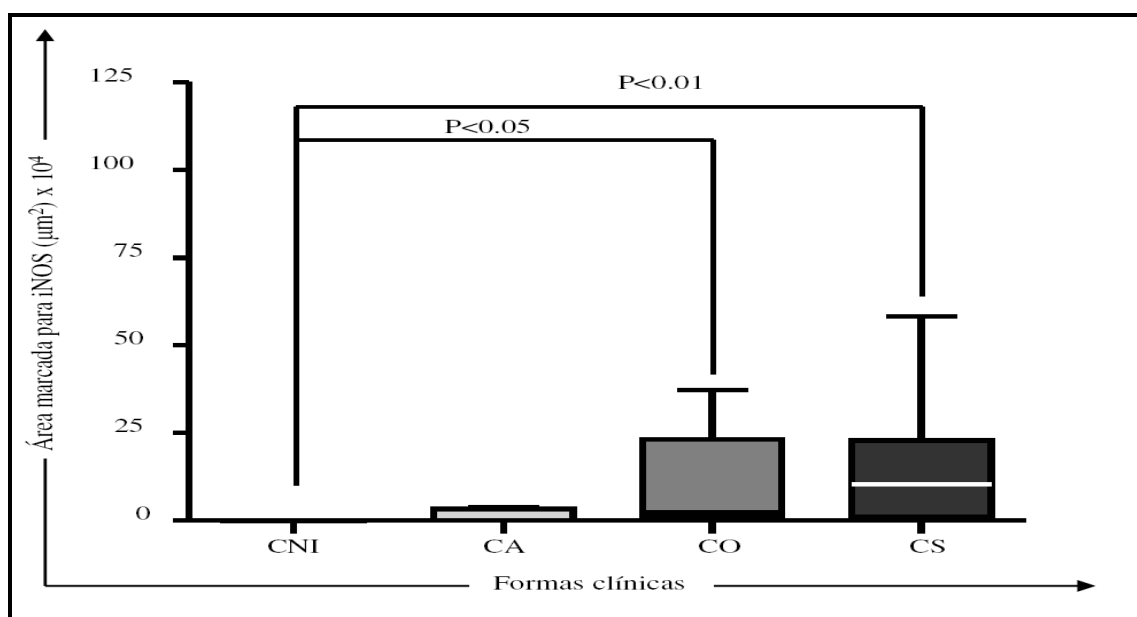


Figura 9 - Avaliação quantitativa da expressão de Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) no baço de cães não infectados (CNI, n=8) e naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*, classificados por formas clínicas de LVC (CA; n=8, CO; n=8 e CS; n=13). Diferença significativa entre CNI e CO representada por  $p < 0,05$  e entre CNI e CS representada por  $p < 0,01$ . Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn. Imuno-histoquímica anti-iNOS



#### 4.4.2.2 Expressão esplênica de iNOS comparada por carga parasitária

Não foram encontradas diferenças significativas quando os valores da expressão de iNOS foram agrupados por carga parasitária ( $p=0,055$ ). As medianas de iNOS em cães com BP, MP e AP foram 4302, 21523, e 171524  $\mu\text{m}^2$  respectivamente. Os resultados demonstram que 50% dos cães com BP não expressam níveis detectáveis da enzima, no entanto, em 100% dos cães com AP a expressão ocorre (Figura 10).

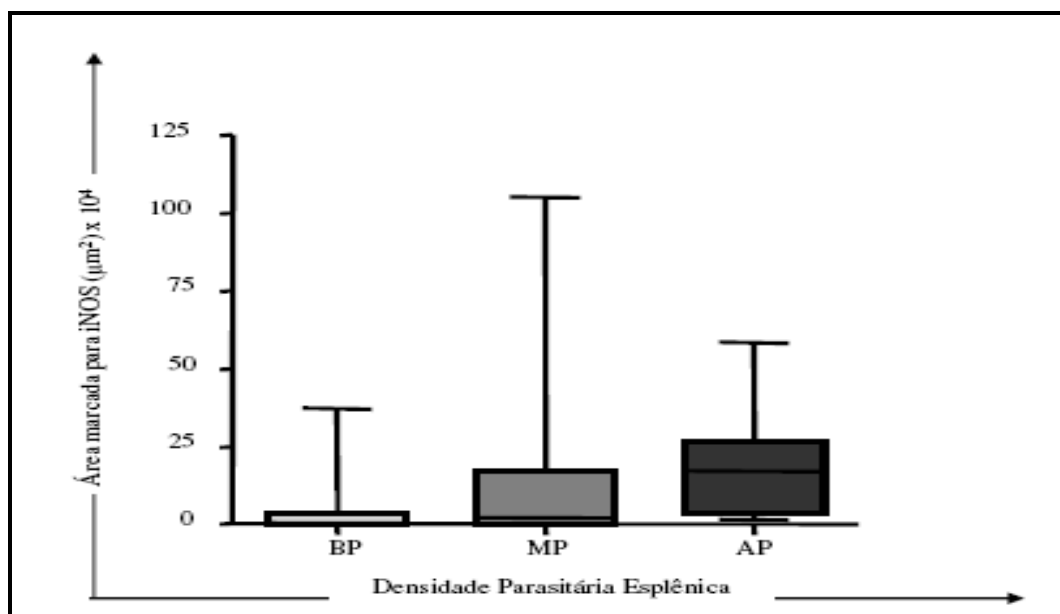


Figura 10 – Avaliação quantitativa da expressão de Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) no baço de cães não infectados (CNI,  $n=8$ ) e naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi*, classificados por densidade parasitária esplênica (Baixo parasitismo: LDU entre 0 e 10), médio parasitismo: LDU entre 11 e 250 e alto parasitismo: LDU entre 251 e 2564).  $p>0,05$ . Teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn.

#### 4.4.2.3 Análise de correlação entre a expressão da iNOS com níveis esplênicos de IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ e com níveis de IgG1, IgG2 e IgG total anti-*Leishmania*

Foram realizadas análises de correlação de Spearman entre os dados quantitativos da expressão de iNOS em CI com os níveis de IL-10,

IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , não sendo encontrados resultados significativos ( $p > 0,05$ ) (Figura 11). As análises de correlações entre os dados quantitativos da expressão de iNOS em CI com os níveis de IgG Total anti - *Leishmania*, IgG1 e IgG2 também não apresentaram resultados significativos ( $p > 0,05$ ) (Figura 12).

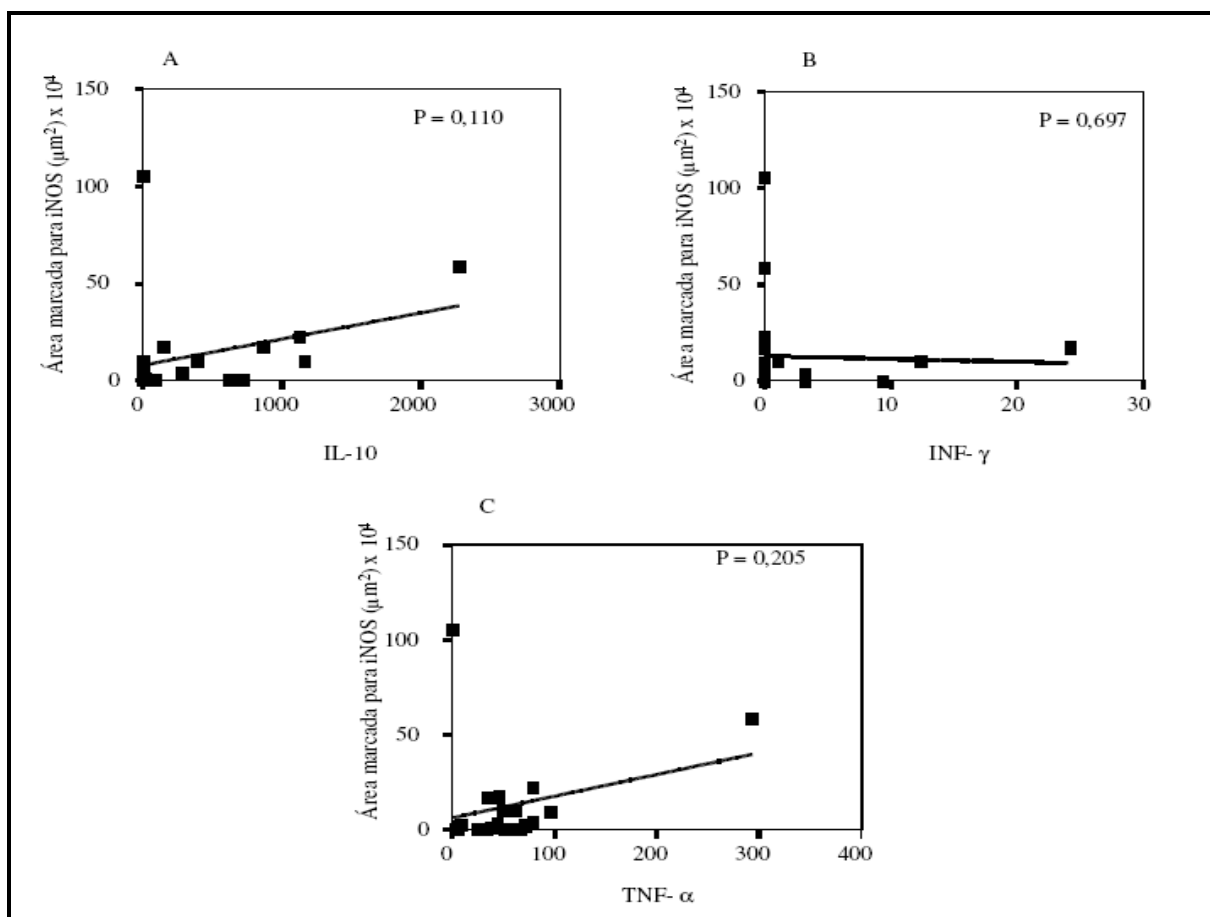


Figura 11 – Correlação de Spearman da expressão esplênica de iNOS em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI; n=21) com a expressão esplênica de IL-10 (A;  $p=0,110$ ), IFN- $\gamma$  (B;  $p=0,697$ ) e TNF- $\alpha$  (C;  $p=0,205$ ).

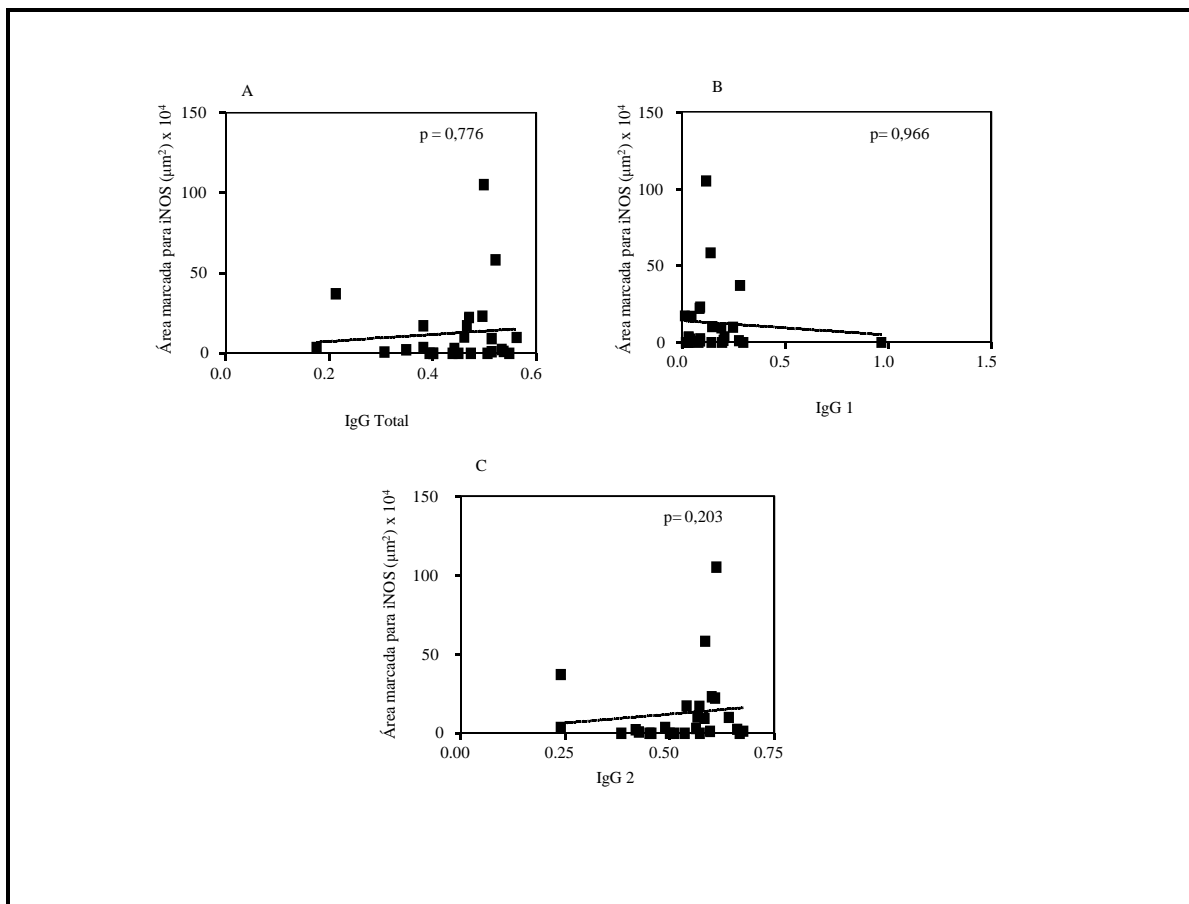


Figura 12 – Correlação de Spearman da expressão esplênica de iNOS em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* (CI; n=24) com as imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG total anti-*Leishmania* (A;  $p=0,076$ ), IgG1 (B;  $p=0,999$ ), IgG2 (C;  $p=0,203$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A LV apresenta ampla distribuição epidemiológica em áreas tropicais e subtropicais do globo (TESH, 1995). É uma das mais relevantes e emergentes doenças parasitárias de todo o mundo, podendo levar a 98% de mortalidade se não tratada. No Brasil, a importância da LV está no fato da sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, seu processo de expansão, urbanização e na possibilidade de atingir formas graves associadas à desnutrição e infecções concomitantes. Na maioria das áreas endêmicas 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos, sendo notificados aproximadamente 1980 casos por ano. Destes, 90% situam-se na região nordeste (GONTIJO & MELO, 2004; SILVA *et al.*, 2001).

Do ponto de vista epidemiológico a LVC é apontada como mais importante que a doença humana devido a sua maior prevalência e pelo fato de CA e CS serem infecciosos ao inseto vetor e principalmente devido à infecção canina anteceder o aparecimento de casos humanos (DEANE & DEANE, 1954; KEENAN *et al.*, 1984b; ABRANCHES *et al.*, 1991a; MOLINA *et al.*, 1994).

A susceptibilidade canina à infecção e o *status* clínico desenvolvido estão relacionados com diversos mecanismos de interação parasito-hospedeiro. Para contribuir com os avanços na elucidação destes mecanismos em LVC foram realizados neste estudo, a avaliação da carga parasitária esplênica, quantificação dos níveis séricos de NO e a expressão da enzima iNOS, associando os resultados obtidos com níveis da expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IgG1, IgG2 e IgG total anti-*Leishmania*.

Os resultados na Figura 1 e Tabela 1 mostram aumento da carga parasitária em cães sintomáticos, ou seja, com maior comprometimento clínico. Estes resultados se aproximam do exposto por alguns autores que relataram haver correlação entre a carga parasitária do baço e linfonodos e o agravamento clínico da LVC (SANCHEZ *et al.*, 2004; GIUNCHETTI *et al.*, 2006). Os resultados estão também de acordo com o

exposto por REIS *et al.* (2006a) que apresentaram uma correlação entre o status clínico na LVC e grau de parasitismo mostrado em escala decrescente, refletido pela ordem: medula óssea, baço, linfonodos, pele e fígado.

A quantificação de NO tem sido realizada por vários pesquisadores, devido ao seu potencial citotóxico relacionado com mecanismos de defesa inata em várias doenças infecciosas (MACHADO *et al.*, 2004). Na Leishmaniose, PANARO *et al.*, (1999) demonstraram o potencial microbicida do NO em macrófagos humanos infectados com *L. infantum* estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS bacteriano. Anteriormente, VOULDOUKIS *et al.*, (1996) haviam demonstrado a capacidade microbicida do NO ao relatar o aumento sérico de L-citrulina, metabólito da L-arginase, ao sofrer ação da iNOS, em cães infectados com *Leishmania infantum* submetidos a tratamento com antimonial pentavalente (glucantime).

Enfatizando a importância do NO como agente leishmanicida pesquisadores demonstraram que macrófagos caninos, anteriormente vacinados com promastigotas mortas de *Leishmania infantum*, apresentam maior capacidade de produção de NO associada à maior capacidade de matar o parasito (PANARO *et al.*, 2001). PINELLI *et al.*, (2000) apresentaram aumento dos níveis de NO em sobrenadante de cultura de macrófagos caninos infectados com *Leishmania infantum* ativados com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 e LPS. Outros trabalhos mostraram a importância dessas citocinas na ativação da expressão de iNOS e conseqüentemente da produção de NO (LIEW *et al.*, 1990a,b).

PANARO *et al.* (2008), em experimentos “in vitro”, sugeriram que a produção de NO está envolvida na proteção e no prognóstico de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, mostrando que a adoção de linfócitos autólogos reduzia a produção de NO por macrófagos de animais sintomáticos e assintomáticos à medida que a infecção se tornava mais crônica.

Neste trabalho, os resultados demonstram que CI apresentaram a mediana dos níveis séricos de NO significativamente maiores que a mediana do grupo de CNI ( $p < 0,05$ ) (Figura 2). Entre os CI, os níveis de

NO em CS foram significativamente maiores quando comparados aos níveis obtidos em CNI ( $p < 0,01$ ) (Figura 3). Quando avaliados os níveis séricos de NO em relação à carga parasitária encontraram-se níveis significativamente menores de NO em cães com BP em relação a MP ( $p < 0,05$ ) e AP ( $p < 0,001$ ). Reforçando estes resultados a análise de correlação entre NO sérico e carga parasitária revelou uma forte correlação positiva ( $p = 0,0001$ ,  $r = 0,6444$ ) (Figura 4A e B).

O aumento da produção de NO em cães naturalmente infectados com alto parasitismo e sintomáticos poderia ser induzido por moléculas do parasito como o LPG (LIEW *et al.*, 1997). Naquele trabalho, os autores relataram que fosfoglicanos (PG) liberados pelo parasito são capazes de inibir ou induzir a síntese de NO por macrófagos murinos estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS. No entanto, estes são aspectos controversos, pois experimentos realizados revelaram que moléculas presentes na *Leishmania* como LPG podem inibir a produção de IL-12, que é o principal indutor de resposta do Tipo 1 (PROUDFOOT *et al.*, 1996; LIEW *et al.*, 1997).

Foi encontrada uma associação entre os níveis séricos de NO e a expressão esplênica da citocina TNF- $\alpha$  ( $p = 0,005$ ) e entre a produção de IgG2 ( $p = 0,019$ ) e IgG total ( $p = 0,047$ ) (Figuras 5 e 6). É sabido que o TNF- $\alpha$  é uma das citocinas indutoras da ativação da expressão de iNOS (LIEW *et al.* 1990b) e esta citocina pode ser produzida por macrófagos, células Th1, Th2 e mastócitos (BEUTLER & CERAMI, 1989).

A correlação positiva com os isotipos de IgG sugere uma polarização da resposta para o perfil Th2. Animais susceptíveis desenvolvem uma resposta tipicamente Th2 e uma resposta humoral exuberante (HONORÉ *et al.*, 1998; ROLÃO *et al.*, 2007). Níveis maiores de IgG2 têm sido registrados relacionados a mau prognóstico (BOURDOISEAU *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2006c) bem como a bom prognóstico na LV (DEPLAZES *et al.*, 1995; NIETO *et al.*, 1999), havendo controvérsias entre os autores, necessitando-se investigações adicionais.

Deve-se considerar também o fato deste estudo ter sido realizado com cães naturalmente infectados. A produção de NO pode ter sido importante na fase aguda da doença, definindo qual seria o prognóstico dos cães. MANNA *et al.*, (2006) relataram em estudo de “coorte” que cães assintomáticos naturalmente infectados com *L.infantum* que apresentaram expressão de IFN- $\gamma$  no tempo inicial do estudo permaneceram assintomáticos ou evoluíram com poucos sintomas, mas animais que não apresentaram esta expressão evoluíram para forma clínica sintomática. A expressão de iNOS em modelo murino, na fase aguda, tem demonstrado que o NO gerado promove o controle de infecções por *L. major*, sendo expressa na pele e linfonodos drenantes da lesão em camundongos resistentes C57BL/6 levando à diminuição no número de parasitos. Já em camundongos susceptíveis, que não se curam espontaneamente (BALB/c), esta expressão é significativamente menor e não ocorre redução da carga parasitária (STENGER *et al.*, 1994).

Outro importante aspecto que pode explicar em parte a presença de maiores níveis de NO em cães apresentando alto parasitismo é a possibilidade de parte da produção do NO ter sido sintetizada pelas próprias leishmanias. Alguns autores demonstraram a capacidade de leishmanias produzirem NO e relacionaram este aspecto diretamente à capacidade infecciosa do parasito. A produção de NO por formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* foi demonstrada, ocorrendo diminuição quando se emprega o uso de inibidores de NOS como o L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil ester). Estes autores sugeriram ainda que o NO gerado pelo parasito possa diminuir a resposta microbicida dos macrófagos reduzindo a atividade da iNOS, possivelmente por atuar em mecanismos pós-transcricionais da enzima, inibindo a produção de NO ou retardando a apoptose da célula parasitada. Também demonstraram que a capacidade de produzir NO está presente em várias espécies como *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. chagasi* em mecanismos dependentes do  $Ca^{2+}$  (GENESTRA *et al.*, 2006 a,b; 2003). Os mecanismos de regulação da síntese de NO têm sido amplamente investigados e sua produção pode ser inibida por um

mecanismo de “feedback” negativo, onde o NO regula sua própria produção (LIEW, 1994).

Os resultados sugerem que maiores níveis de NO, na fase crônica da LVC, estão associados a mau prognóstico, relacionados com alto parasitismo, podendo-se inferir que o NO pode ser usado como biomarcador da progressão clínica da doença. No entanto, seriam necessários trabalhos adicionais para se estabelecer uma afirmação, pois existem limitações metodológicas que devem ser consideradas na dosagem sérica do NO pelo método de Griess cujos resultados podem não refletir apenas os aspectos relacionados com a doença, mas também interferência pela dieta ou produção de nitritos pela flora intestinal (MARZINZIG *et al.*, 1997). É importante ressaltar que a validade da determinação das concentrações de nitrito e nitrato como verdadeiro índice da produção de NO endógeno poderia gerar controvérsias devido a fatores como: interações químicas *in vivo* (KNOWLES & MONCADA, 1994; BENJAMIN & VALLANCE, 1994). No entanto, o método de Griess tem sido validado por diversos autores que mostram que as concentrações de nitrito e nitrato alteram-se como resultado de diversas doenças (FARREL *et al.*, 1992; MIDDLETON *et al.*, 1993; BALDEWEG *et al.*, 1996).

A análise qualitativa da expressão da iNOS é apresentada na Figura 7 e Tabela 2. Podem ser observados diferentes tipos de marcação imuno-histoquímica. O grupo de CNI não apresentou marcação detectável. Quando os animais foram avaliados de acordo com a forma clínica verificou-se que a marcação em CA variou de leve a moderada e não se encontrou nestes animais marcação acentuada em nenhum dos critérios adotados. Por sua vez, os grupos CO e CS apresentaram uma maior frequência e intensidade da expressão de iNOS, sendo mais proeminente no último. Esta marcação pode estar relacionada com os eventos inflamatórios observados na LVC. O tipo de marcação difusa pode estar relacionado com a intensa hiperplasia de macrófagos no baço de cães com LV (TAFURI *et al.*, 2001). A marcação focal pode estar relacionada com a marcação principalmente nas PALMS, ZM ou folículos, pois macrófagos e células dendríticas estão presentes nessas



estruturas e podem estar ativadas e produzir iNOS. Já a marcação pontual relaciona-se com marcação em células isoladas. Quanto à marcação nos vasos esplênicos, MONCADA *et al.* (1991) citam várias células capazes de expressar iNOS, entre elas as células endoteliais que são possivelmente as marcadas neste experimento.

Uma possível explicação para a expressão da iNOS por CI conforme a Figura 8 pode estar ocorrendo via receptores do tipo Toll (TRLs), uma importante família de receptores presentes em células imunes de mamíferos que reconhecem motivos conservados de patógenos (padrão molecular associado à patógenos – PAMPs). Os TRLs presentes nas membranas dos macrófagos ou linfócitos de cães podem estar sendo ativados por PAMPs presentes nas leishmanias (LPG) (BECKER *et al.*, 2003; LIESE *et al.*, 2007). Esta ativação leva a produção de citocinas pró-inflamatórias dependente da ativação do fator nuclear kB (NFkB), o qual dispara mecanismos efetores microbiostáticos/microbicidas por animais resistentes em infecções por *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium sp.* (TAKEDA *et al.*, 2003; GAZZINELLI *et al.*, 2004).

Observou-se claramente que havia uma maior expressão de iNOS associada à gravidade da doença considerando-se avaliação semi-quantitativa (Tabela 2) e esta forte marcação estava associada aos cães apresentando alto parasitismo esplênico, embora esta observação não tenha se tornado uma regra e tenham sido encontrados cães com médio ou baixo parasitismo com alta expressão de iNOS, bem como CS ou com alto parasitismo com baixa expressão de iNOS.

O aumento da expressão de iNOS estar associado com a forma clínica, considerando-se as análises semi-quantitativa e quantitativa de iNOS, (mais intenso em CS e CO) pode estar relacionado ao maior número de cães com AP nestes grupos (Tabela 2, Figura 9). Quanto a CNI não apresentar marcação detectável, está de acordo com resultados de LAGE *et al.* (2007) cujo trabalho revelou que este grupo não apresenta expressão esplênica de IFN- $\gamma$ , que por sua vez tem sido demonstrado estar relacionado com a ativação da expressão de iNOS

(HEVEL & MARLETTA, 1992; HOLAN *et al.*, 2006; NIEDBALA *et al.*, 2002; PINELLI *et al.* 2000).

Apesar de não ter sido observado diferença significativa quanto à expressão esplênica de iNOS por densidade parasitária esplênica, do ponto de vista semi-quantitativo (Tabela 1 e 2) os resultados sugerem que a maior expressão de iNOS não está necessariamente ligada à redução da carga parasitária no tecido esplênico ou que esta expressão ultrapassa os níveis ideais para o clearance esplênico e torna-se tóxico ao hospedeiro possivelmente pela geração de peroxinitrito (PACHER *et al.*, 2007). ANDERSON *et al.*, (2005) mostraram que camundongos C57BL/6 geralmente resistentes, quando experimentalmente infectados por cepas virulentas de *L. major*, falharam em eliminar os parasitos, apesar de expressarem altos níveis de iNOS na lesão e de apresentarem uma resposta polarizada de Th1.

Deve-se considerar ainda que a expressão de iNOS e a produção de NO são apenas parte da resposta imune na LVC. REIS *et al.*, (2006b) demonstraram que CI apresentam diminuição nas taxas de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no sangue periférico comparados a CNI e que CA apresentam significativamente maior quantidade células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> que CS, bem como maior expressão MHC classe II por linfócitos circulantes. Assim, a queda na taxa de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, bem como a queda de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, importantes fontes de IFN- $\gamma$  poderiam levar os macrófagos de CS e CO a estarem ineficientes em promoverem a eliminação dos parasitos, por uma ativação incompleta devido à insuficiente produção de IFN- $\gamma$ . De forma semelhante CARRERA *et al.*, (1996) sugerem que a produção de IL-12 é firmemente regulada em macrófagos murinos por promastigotas de leishmanias durante a infecção. Assim, o controle dessa importante citocina ativadora de resposta do Tipo 1 pode estar associada, de forma indireta, às insuficientes produções de IFN- $\gamma$  e expressão de iNOS que seriam necessários para promover a morte dos parasitos em CI.

Há muitas evidências clínicas e experimentais indicando que a resolução da infecção leishmanial é dependente de células T e

macrófagos ativados por citocinas derivadas de células T, havendo trabalhos demonstrando a importância do IFN- $\gamma$  no controle das leishmanioses (CARVALHO *et al.*, 1985; LIEW *et al.*, 1982; SACKS *et al.*, 1987). Outros estudos relataram cães assintomáticos com LVC apresentando aumento na produção de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (CABRAL *et al.*, 1992; PINELLI *et al.*, 1994a,b; PINELLI *et al.*, 1995). Contrariamente, a IL-10 tem sido associada à supressão de produção de citocinas do Tipo 1 e à modulação da atividade leishmanicida de macrófagos (BOGDAN *et al.*, 1991; MOSMANN & MOORE, 1991). A expressão de RNAm do IFN- $\gamma$  está diminuída no início de infecção experimental de cães infectados com *Leishmania infantum*. Num período pré-patente subsequente ocorre aumento do IFN- $\gamma$  e posterior decréscimo quando aparecem os sinais clínicos da doença, havendo também expressão de RNAm para IL-10 em cultura de células mononucleares do sangue periférico (SANTOS-GOMES *et al.*, 2002). CORREA *et al.*, (2007) demonstraram que cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* apresentam maiores níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  e estas tem sido associadas com forte inibição da capacidade microbicida de macrófagos. GAZZINELLI *et al.*, (1992) mostram que a IL-10 e TGF- $\beta$  também inibiram a morte de formas tripomastigostas do *Trypanosoma cruzi* por macrófagos murinos ativados por IFN- $\gamma$  em mecanismo dependente de NO. Por sua vez, resultados obtidos por ANDERSON *et al.* (2005) mostraram que em camundongos C57BL/6 geralmente resistentes à infecção por *L. major* quando inoculados com cepas do parasito resistente ao tratamento não ocorria a cura da lesão na derme mesmo com uma polarização de resposta do Tipo 1, havendo aumento da carga parasitária, demonstrando que a produção de IL-10 estava relacionada com o aumento da susceptibilidade.

Apesar de não ter sido observada correlação entre a iNOS e as citocinas IL-10, IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$ , e os anticorpos IgG1, IgG2 ou IgG total anti-*Leishmania* ( $p > 0,05$ ) (Figuras 11 e 12), LAGE *et al.* (2007) demonstraram uma correlação entre IL-10 e o *status* clínico severo e alta

carga parasitária ao descrever que 100% dos CI com AP apresentavam expressão de RNAm de IL-10.

A susceptibilidade à infecção pode ser devido ao estabelecimento de circuitos imunorregulatórios, onde a maior indução de citocinas regulatórias como o TGF- $\beta$  e IL-10 poderia render os macrófagos ineficientes no clearance dos parasitos (BELKAID *et al.*, 2001; GANTT *et al.*, 2003, ANDERSON *et al.*, 2005; CORREA *et al.*, 2007).

Também podemos supor que em LVC possa ocorrer a participação de células T regulatórias (Treg) anteriormente estudadas no modelo murino (XU *et al.*, 2003), como as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que poderiam estar elevando os níveis esplênicos de IL-10 impedindo a polarização para resposta do Tipo 1, modulando a produção de IFN- $\gamma$ , iNOS, NO e conseqüentemente protegendo o parasito contra os mecanismos microbicidas dos macrófagos (RONCAROLO *et al.*, 2006; ANDERSON *et al.*, 2005). Resultados opostos foram apresentados por NYLEN *et al.*, (2007), que descartam estas células como principais fontes de IL-10 na fase inicial da leishmaniose humana.

A importância da participação da IL-10 na persistência do parasito é reforçada por alguns autores que demonstraram em camundongos nocautes para IL-10 ou uso de anticorpos bloqueadores anti-IL-10 levava a cura estéril quando infectados com *L. major*. No entanto, ocorria latência da leishmaniose quando havia expressão de IL-10. Estes autores demonstraram ainda que a IL-10 produzida por células Treg ocorreria naturalmente, e era crucial para persistência da infecção por *L. major* em leishmaniose cutânea em modelo murino (BELKAID *et al.*, 2002).

A suposta participação de células regulatórias merece investigação em futuros trabalhos, principalmente relacionando sua presença com a forma clínica, pois renderiam informações que poderiam elucidar aspectos ignorados da imunopatologia em LVC.

A falha na eliminação dos parasitos mesmo quando o baço canino está expressando altos níveis de iNOS, pode estar ligado a mecanismo de escape dos parasitos pela expressão de moléculas por leishmanias como as peroxidoxinas LcPxn-1 e LcPxn-2 ou superóxido dismutase que

conferem proteção aos parasitos contra os mecanismos microbicidas (OLIVIER *et al.*, 2005).

Ainda entre os possíveis mecanismos de escape presentes no gênero *Leishmania*, relata-se a sua capacidade de liberar cathepsina B, uma protease capaz de clivar TGF- $\beta$  latente à forma ativa imunossupressora capaz de prolongar a sobrevivência do parasito em macrófagos (WILSON *et al.*, 2005).

Além dos mecanismos de escape dos protozoários deve-se considerar o fato de termos trabalhado com cães naturalmente infectados, estes poderiam estar parasitados por diferentes cepas de *L. (L.) chagasi* e estas poderiam apresentar maior ou menor patogenicidade e virulência sendo mais ou menos resistentes ao NO gerado pela célula hospedeira (NATAMI *et al.*, 2000).

A determinação da forma clínica que se estabelece no animal pode estar relacionada com diferenças genéticas (HOWARD *et al.*, 1980; FOWELL & LOCKSLEY, 1999; LIPOLDOVÁ *et al.*, 2000, 2002), infecções concomitantes (BARRAL-NETTO *et al.*, 1995; HASSAN *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ-SOSA *et al.*, 2006), número de picadas e efeito da saliva de flebótomos infectados (MBOW *et al.*, 1998; DE MOURA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e fatores nutricionais (HOLZMULLER *et al.*, 2006; ANSTEAD *et al.* 2001; 2003).

## 6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados sugerem que em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* a exacerbação das formas clínicas está associado ao aumento da carga parasitária, aumento do níveis séricos de NO e da expressão esplênica de iNOS. O estabelecimento de circuitos imunorregulatórios com a produção de citocinas regulatórias poderia tornar os macrófagos dos cães infectados inefetivos na eliminação dos parasitos e a produção de NO poderia estar associada aos mecanismos imunopatológicos na LVC.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABRANCHES, P.; CAMPINO, L e SANTOS-GOMES G. M. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. **Acta Med Port**, v.11, n.10, p.871-5. Oct, 1998.

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C.; CONCEICAO-SILVA F. M.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **Journal Parasitology**, v.77, n.4, p.557-61. Aug, 1991a.

ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES G.; RACHAMIM N.; CAMPINO L.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite immunology**, v.13, n.5, p.537-50. Sep, 1991b.

ADAMS, H. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **J Am Vet Med Assoc**. V.209, n7, p 1297-1302. 1996.

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **The Journal of Immunology**, 174: 2934-2941.2005.

ANSTEAD, G. M.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; YANG J.; PEREZ L. E.; MELBY, P. C. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and immunity**, v.69, n.8, p.4709-18. Aug, 2001.

ANSTEAD G. M.; CHANDRASEKAR B.; ZHANG Q.; MELBY P. C. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network, nuclear factor-kappaB activation, and nitric oxide production. **J Leukoc Biol**;v.74(6), p.982-91. Dec, 2003.

APPAY, V.; NIXON, D. F.; DONAHOE, S. M.; GILLESPIE, G. M.; DONG, T.; KING, A.; OGG, G. S.; SPIEGEL, H. M.; CONLON, C.; SPINA, C. A.; HAVLIR, D. V.; RICHMAN, D. D.; WATERS, A.; EASTERBROOK, P.; MCMICHAEL, A. J.; ROWLAND-JONES, S. L.. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. **The Journal of Experimental Medicine**, v.192, n.1, p.63-75. Jul, 2000.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J.. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88. 2004.

AMBER, L. J.; HIBBS, J. B. JR.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. The L-arginine dependent effector mechanism is induced in murine adenocarcinoma cells by culture supernatant from cytotoxic activated macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v.43,p.187-192. 1988.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A.; JERONIMO JR. S.; CARVALHO E. M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v.12, n.8, p.1228-31. Aug, 2000.

BADARO, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, JR. W. D. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.154, n.6, p.1003-11. Dec, 1986.

BALDEWEG, T.; SOORANNA, S.; DAS, I.; CATALAN, J.; GAZZARD. B. Serum nitrite concentration suggest a role for nitric oxide in AIDS. **AIDS**, v.10, n.4, p.451-452. 1996.

BARRAL-NETTO M, DA SILVA JS, BARRAL A, REED S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. **Am J Pathol**. 146(3):635-42. Mar, 1995.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANJEIRA, D. F.; ANDRADE FILHO, F. A. DE; TRIGO, J.; JULIAO, F. S.; FRANKE, C. R.; PALIS AGUIAR, P. H.; CONRADO DOS-SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v.171, n.2, p.331-9. Mar, 2006.

BAYLIS C.; VALLANCE P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? **Curr Opin Nephrol Hypertens**. V.7(1), p.59-62. Jan, 1998.



BECKER, I.; SALAIZA, N.; AGUIRRE, M.; DELGADO, J.; CARRILLO-CARRASCO, N.; KOBEH, L. G.; RUIZ, A.; CERVANTES, R.; TORRES, A. P.; CABRERA, N.; GONZALEZ, A.; MALDONADO, C.; ISIBASI, A. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.130, n.2, p.65-74. Aug, 2003.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **The Journal of Experimental Medicine**, v.194, n.10, p.1497-506. Nov, 2001.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature**, v.420, n.6915, p.502-7. Dec, 2002.

BENJAMIN, N.; VALLANCE, P. Plasma nitrite as a marker of nitric oxide production. **Lancet**, v. 344, n.8927, p.960. 1994.

BEUTLER B, CERAMI A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. **Annu Rev Immunol**.;7:625-55. Review. 1989

BOGDAN, C. Of microbes, macrophages and nitric oxide. **Behring Institute Mitteilungen**, n.99, p.58-72. Mar, 1997.

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

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **The Journal of Experimental Medicine**, v.174, n.6, p.1549-55. Dec 1, 1991.

BORJA-CABRERA, G. P.; CRUZ MENDES, A.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; HASHIMOTO OKADA, L. YKAWASAKI.; J. K.; DE A. TRIVELLATO F. A.; COSTA A. C.; REIS, A. B.; GENARO, O.; BATISTA, L. M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v.22, n.17-18, p.2234-43. Jun 2, 2004.

BOURDOISEAU, G., C. BONNEFONT, E. HOAREAU, C. BOEHRINGER, T. STOLLE E L. CHABANNE. Specific IGG1 and IGG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.59, n.1-2, p.21-30. Oct 6, 1997.

BRAGA, M. D. M.; COELHO, I. C. B.; POMPEU, M. M. L.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA M. J.; LIMA, J. W. D. O. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.5, p.419-424. 1998.

BRANDONISIO O.; PANARO M. A.; SISTO M.; ACQUAFREDDA A.; FUMAROLA L.; LEOGRANDE D.; MITOLO V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. **Parassitologia**. v. 43 Suppl 1, p.1-6. 2001.

BRANDONISIO, O.; SPINELLI R.; PEPE M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v.6, n.15, p.1402-9. Dec, 2004.

BRENDOLAN, A.; ROSADO, M. M.; CARSETTI, R.; SELLERI, L.; DEAR, T. N. Development and function of the mammalian spleen. **Bioessays**, v.29, n.2, p.166-77. Feb, 2007.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite immunology**, v.14, n.5, p.531-9. Sep, 1992.

CARRERA, L.; GAZZINELLI, R. T.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; MULLER, W.; KUHN, R.; SACKS, D. L. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v.183, n.2, p.515-26. Feb 1, 1996.

CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; REED, S. G.; JONES, T. C.; JOHNSON, JR. W. D. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **The Journal of clinical investigation**, v.76, n.6, p.2066-9. Dec, 1985.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p.417-23. 2002.

CESTA, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicological Pathology**, v.34, n.5, p.455-65. 2006.

CORREA, A. P.; DOSSI, A. C.; OLIVEIRA VASCONCELOS, R. DE; MUNARI, D. P.; DE LIMA, V. M. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.3-4, p.267-74. Feb 28, 2007.

COSTA, C. H.; GOMES, R. B.; SILVA, M. R.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K.; SANTOS, R. S.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.182, n.3, p.997-1000. Sep, 2000.

COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F.; PEREIRA, F. C.; TAVARES, J. P.; ARAUJO M. V.; GONCALVES, M. J. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.93, n.5, p.464. Sep, 1999.

DE MOURA T. R.; OLIVEIRA F.; NOVAIS F. O.; MIRANDA J. C.; CLARÊNCIO J.; FOLLADOR I.; CARVALHO E. M.; VALENZUELA J. G.; BARRAL-NETTO M.; BARRAL A.; BRODSKYN C.; DE OLIVEIRA C. I. Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. **PLoS Negl Trop Dis**. v.28, n.2, p.84. Nov, 2007.

DEANE, L. M.; DEANE M. P. Dogs naturally infected by *Leishmania donovani* in Ceara. **Hospital (Rio J.)**, v.45, n.6, p.703-7. Jun, 1954.

DENICOLA A.; SOUZA J. M.; RADI R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.3566-3571. 1998.

DEPLAZES, P.; SMITH, N. C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IGG1 and IGG2 antibody responses of dogs to *Leishmania*

infantum and other parasites. **Parasite immunology**, v.17, n.9, p.451-8. Sep, 1995.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v.97 Suppl 1, p.3-15. Oct, 2003.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G.; Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343-350. 2003.

ELLIS G.; ADATIA I.; YAZDANPANAH M.; MAKELA S. K. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. **A Clin Biochem**, v. 31, n.4, p.195-220. Jun; 1998.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; COTTERELL, S. E.; MYNOTT, T. L.; TSCHANNERL, A.; GORAK-STOLINSKA, P. M.; KAYE, P. M. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **The American Journal of Pathology**, v.161, n.2, p.429-37. Aug, 2002.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v.20, n.11, p.524-30. Nov, 2004.

FAINT, R. W.; MACKIE, I. J.; MACHIN, S. J. Platelet aggregation is inhibited by a nitric oxide-like factor released from human neutrophils in vitro. **Br. J. Haematol.**, v.77, p.539-545. 1991.

FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Increased concentration of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann. Reum. Dis.**, v. 51, p.1219-1222. 1992.

FAHEY, T. J.; YOSHIOKA, T.; SHIRES, G. T.; FANTINI, G. A. The role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the acute cardiovascular response to endotoxin. **Ann. Surg.** V.223, n1, p.63-69, 1996.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Ass Med Bras**, v.46, n.3, p.265-71. 2000.

FOWELL DJ, LOCKSLEY RM. *Leishmania major* infection of inbred mice: unmasking genetic determinants of infectious diseases. *Bioessays*. 21(6):510-8. Jun, 1999.

FÖRSTERMANN, U; DUN, N. J. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthases. **Methods in Enzymology**, v.268, p. 510–515. 1996.

GANTT, K. R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, E. T.; GOLDMAN, T. L.; RECKER, T. J.; MILLER, M. A.; WILSON, M. E. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. **Journal of Immunology**, v.170, n.5, p.2613-20. Mar 1, 2003.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European journal of immunology**, v.22, n.10, p.2501-6. Oct, 1992.

GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C.; CAMPOS, M. A. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v.201, p.9-25. Oct, 2004.

GENESTRA, M.; SOUZA, W. J.; GUEDES-SILVA, D.; MACHADO, G. M. C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; BEZERRA, R. J. S.; MONTEIRO, F.; LEON, L. L. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. **Archives of Microbiology**, v.185, p.348–354. 2006a.

GENESTRA, M.; GUEDES-SILVA, D.; SOUZA, W. J. S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; SOARES-BEZERRA, R. J.; MONTEIRO, F. P.; LEONA, L. L. Nitric Oxide Synthase (NOS) Characterization in *Leishmania amazonensis* Axenic Amastigotes. **Archives of Medical Research**, v.37, p.328–333. 2006b.

GENESTRA, M; SOUZA, W. J. S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. L. Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp. **Medical Microbiology and Immunology**. v.192, p.217–223.2003.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v.135, n.2-3, p.100-7. Aug, 2006.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, v. 84, p. 269-277. 2008.

GOMES-PEREIRA, S.; RODRIGUES, O. R.; SANTOS-GOMES, G. M. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. **Immunology Letters**, v.95, n.1, p.63-70. Aug 15, 2004.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO M. L. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, Jan-p.71-80. Feb, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-49. 2004.

GRABBE, S.; SCHUWARZ, T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. **Immunology Today**, v.19, p.37-42. 1998.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n.1, p.131-8. Oct, 1982.

GUARGA, J. L.; LUCIENTES, J.; PERIBANEZ, M. A.; MOLINA, R.; GRACIA M. J.; CASTILLO, J. A. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Tropica**, v.77, n.2, p.203-7. Nov 2, 2000.

GUTMAN, S. I.; HOLLYWOOD, C. A. Simple, rapid method for determining nitrates and nitrites in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v.38, n.10, p.2152. Oct, 1992.

HASSAN MF, ZHANG Y, ENGWERDA CR, KAYE PM, SHARP H, BICKLE QD. The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. **Am J Pathol**. v.169, n.3, p.943-53. Sep, 2006.

HERTZ, C. J.; MANSFIELD, J. M. IFN-gamma-dependent nitric oxide production is not linked to resistance in experimental African trypanosomiasis. **Cellular immunology**, v.192, n.1, p.24-32. Feb 25, 1999.

HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A. Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity. **Biochemistry**, v.31, n.31, p.7160-5. Aug 11, 1992.

HOLAN, V., PINDJAKOVA, J.; KRULOVA, M.; NEUWIRTH, A.; FRIC, J.; ZAJICOVA, A. Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism. **Transplantation**, v.81, n.12, p.1708-15. Jun 27, 2006.

HOLZMULLER, P.; HIDE, M.; SERENO, D.; LEMESRE, J. L. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v.6, n.3, p.187-97. May, 2006.

HONORÉ S, GARIN YJ, SULAHIAN A, GANGNEUX JP, DEROUIN F. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 21(3):231-9. Jul; 1998.

HOWARD JG, HALE C, CHAN-LIEW WL. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunol Winter**; 2(4):303-14. 1980.

HUHMER A. F.; NISHIDA C. R.; ORTIZ DE MONTELLANO P. R.; SCHONEICH C. Inactivation of the inducible nitric oxide synthase by peroxynitrite. **Chem Res Toxicol**, v.10, p.618-626. 1997.

IGNARRO L. J. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. **Kidney Int Suppl**, v.6, n.55, p.2-5. Jun, 1996.

JORES, K.; YU, J.; MCCORMACK, D. G. Capillary and arteriolar responses to local vasodilators are impaired in a rat model of sepsis. **J. Appl. Physiol.** V. 84, n.3, p.837-844.1992.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H. K.; JOHNSON A. J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v.21, n.1, p.74-9. Jan, 1984a.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; JOHNSON, A. J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. **Pathology. Veterinary Pathology**, v.21, n.1, p.80-6. Jan, 1984b.

KNOWLES, R. E.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammal. **Biochem. J.** v. 298, p. 249-258. 1994.

KUMAR, P.; SHARMA, P. K.; JAIN, R. K.; GAUTAM, R. K.; BHARDWAJ, M.; KAR, H. K. Oral ulcer as an unusual feature of visceral leishmaniasis in an AIDS patient. **Indian Journal of Medical Sciences**, v.61, n.2, p.97-101. Feb, 2007.

LAGE, R. S.; OLIVEIRA, G. C.; BUSEK, S. U.; GUERRA, L. L.; GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.115, n.1-2, p.135-45. Jan 15, 2007.

LAINSON, R. Summary of recent abstracts. V. Leishmaniasis. **CDT Digest**, v.1, n.2, p.605-11. Oct, 1970.

LAINSON, R.; RANGEL E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.811-27. Dec, 2005.



LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **British medical bulletin**, v.28, n.1, p.44-8. Jan, 1972.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v.63, n.2, p.134-45. 1988.

LAINSON, R., J. J. SHAW, F. T. Silveira e R. R. Braga. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, n.3, p.517. 1987.

LI H.; POULOS T. L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. **J Inorg Biochem**, v.99, n.1, p.293-305. Jan, 2005.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**. V. 37, Issue 12, P. 3424 – 3434.2007.

LIEW F. Y. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. **Immunol Lett**, v.43(1-2), p.95-98. Dec, 1994.

LIEW, F. Y.; HALE, C.; HOWARD, J. G. Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. **Journal of Immunology**, v.128, n.4, p.1917-22. Apr, 1982.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v.144, n.12, p.4794-7. Jun 15, 1990a.

LIEW, F. Y., Y. LI, S. MILLOTT. Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol**. 145:4306. 1990b.

LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v.352, n.1359, p.1311-5. Sep 29, 1997.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; DE MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v.92, n.1, p.43-53. Sep, 2004.

LIPOLDOVÁ M, SVOBODOVÁ M, KRULOVÁ M, HAVELKOVÁ H, BADALOVÁ J, NOHÝNKOVÁ E, HOLÁN V, HART AA, VOLF P, DEMANT P. Susceptibility to *Leishmania major* infection in mice: multiple loci and heterogeneity of immunopathological phenotypes. **Genes Immun**. 1(3):200-6. Feb, 2000.

LIPOLDOVÁ M, SVOBODOVÁ M, HAVELKOVÁ H, KRULOVÁ M, BADALOVÁ J, NOHÝNKOVÁ E, HART AA, SCHLEGEL D, VOLF P, DEMANT P. Mouse genetic model for clinical and immunological heterogeneity of leishmaniasis. **Immunogenetics**. 54(3):174-83. Jun, 2002.

LIU, H.; HU, B.; XU, D.; LIEW, F. Y. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. **Journal of Immunology**, v.171, n.10, p.5012-7. Nov 15, 2003.

LOHOFF, M.; FERRICK, D.; MITTRUCKER, H. W.; DUNCAN, G. S.; BISCHOF, S.; ROLLINGHOFF, M.; MAK, T. W. Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. **Immunity**, v.6, n.6, p.681-9. Jun, 1997.

LORENTE, L.; ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ALONSO, M. S.; ARIAS, J. Clinical biology of nitric oxide. **British Journal of Surgery**, v.83, p.1010-1019. 1996.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, 2004

MACMICKING, J.; XIE Q.W.; NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review Immunology**, v. 15, p.323-50. April, 1997.

MALLA, N.; MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. **The Indian Journal of Medical Research**, v.123, n.3, p.267-74. Mar, 2006.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.4, p.566-7. 1988.

MANNA L.; REALE S.; VIOLA E.; VITALE F.; MANZILLO V. F.; MICHELE P. L.; CARACAPPA S.; GRAVINO A. E. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v.20, n.142(3-4), p.271-280. Dec, 2006.

MARZINZIG M.; NUSSLER, A. K.; STADLER, J.; MARZINZIG, E.; BARTHLEN, W.; NUSSLER, N.C.; BEGER, H. G.; MORRIS, S. M.; BRUCKNER, U. B. Analytical Methods: Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: Nitrite, nitrate and s-nitrosothiols. **Nitric Oxide: Biology and chemistry**. Vol. 1, n.2, p. 177-189. April, 1997.

MARLETTA, M. A. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. **Chemical Research in Toxicology**, v.1, n.5, p.249-57. Sep-Oct, 1988.

MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v.27, n.24, p.8706-11. Nov 29, 1988.

MARTIN, F.; KEARNEY, J. F. Marginal-zone B cells. **Nature Reviews. Immunology**, v.2, n.5, p.323-35. May, 2002.

MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; DE SOUZA, W. J.; DE TOLEDO, L. M.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO RDA, S.; SABROZA, P. C.; DE SOUZA, M. A.; RANGEL JUNIOR, F. B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n.3, p.349-57. Jul-Sep, 1985.

MAYER, B.; SCHMIDT, K.; HUMBERT, P.; BOHME, E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells  $Ca^{2+}$ -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.164, n.2, p.678-85. Oct 31, 1989.

MBOW ML, BLEYENBERG JA, HALL LR, TITUS RG. Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with Leishmania major. **J Immunol**, v.161, n.10, p.5571-5577. 1998.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. Nature Reviews. **Immunology**, v.5, n.8, p.606-16. Aug, 2005.

MEBIUS, R. E.; NOLTE, M. A.; KRAAL, G. Development and function of the splenic marginal zone. **Critical Reviews in Immunology**, v.24, n.6, p.449-64. 2004.

MIDDLETON, S. J.; SHORTHOUSE, M.; HUNTER, J. O. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colites. **Lancet**, v. 341, p.25-38. 1993.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR J. Infectivity of dogs naturally infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88, n.4, p.491-3. Jul-Aug, 1994.

MONCADA, S., R. M. PALMER E E. A. HIGGS. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v.43, n.2, p.109-42. Jun, 1991.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18, n.9, p.399-405. Sep, 2002.

MOSMANN TR; COFFMAN RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**.;7:145-173.1989.

MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. **Immunology Today**, v.12, n.3, p.A49-53. Mar, 1991.

NATAMI, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; BOUDOUMA, M.; GUESSOUSS-IDRRISSI N.; RHALEM, A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. **Veterinary Research**, v.31, n.3, p.355-63. May-Jun, 2000.

NAGELKERKEN, L.; GOLLOB, K. J.; TIELEMANS, M.; COFFMAN, R. L. Role of transforming growth factor-beta in the preferential induction of T helper cells of type 1 by staphylococcal enterotoxin B. **European journal of immunology**, v.23, n.9, p.2306-10. Sep, 1993.

NICHOLSON, B.; MANNER, C. K.; KLEEMAN, J.; MACLEOD, C. L. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. **J Biol Chem**, v.276, n.19, p.15881-5. May 11, 2001.

NIEDBALA, W.; WEI, X. Q.; CAMPBELL, C.; THOMSON, D.; KOMAI-KOMA, M.; LIEW, F. Y. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor beta 2 expression via cGMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.25, p.16186-91. Dec 10, 2002.

NIETO, C. G.; GARCIA-ALONSO, M.; REQUENA, J. M.; MIRON, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.67, n.2, p.117-30. Feb 1, 1999.

NORMAN J. E.; LIEW F. Y. Nitric oxide. **Mol Med Today**. v.1, n.8, p.358. Nov, 1995.

NYLEN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K. D.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 RNAm in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.204, n.4, p.805-17. Apr 16, 2007.

OLIVEIRA, G. G.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, n.2, p.243-8. Apr-Jun, 1993.

OLIVEIRA F, LAWYER PG, KAMHAWI S, VALENZUELA JG. Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-Leishmania Immune. Response towards Protection or Exacerbation of Disease. **PLoS Negl Trop Dis**.;2(4):e226. Apr 16, 2008

OLIVER, A. M.; MARTIN, F.; GARTLAND, G. L.; CARTER, R. H.; KEARNEY, J. F. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. **European journal of immunology**, v.27, n.9, p.2366-74. Sep, 1997.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev**, v.18, n.2, p.293-305. Apr, 2005.

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.65, n.5, p.510-517.2001.

PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D. D.; MITOLO, V.; SISTO, M.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; BERTANI, F.; CONSENTI, B.; BRANDONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed Leishmania infantum promastigotes. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.24, n.3, p.187-95. Jul, 2001.

PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D. D.; TROTTA, T.; SATALINO, R.; SACCIA, M.; MITOLO, V.; BRANDONISIO, O. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in Leishmania infantum-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, v.29, n.3, p.122-7. 1999.

PANARO M. A.; BRANDONISIO O.; DE CAPRARIIS D.; CAVALLO P.; CIANCIULLI A.; MITOLO V.; OTRANTO D. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated

macrophages in asymptomatic infection? **Parasit Vectors**, v.9, n.1, p.10. 2008.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v.87, n.1, p.315-424. Jan, 2007.

PARKER, S. J.; ROBERTS, C. W.; ALEXANDER, J. CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v.84, n.2, p.207-12. May, 1991.

PILLAI, S. ; CARIAPPA, A.; MORAN, S. T. Marginal zone B cells. **Annu Rev Immunol**, v.23, p.161-96. 2005.

PINELLI, E.; BOOG, C. J.; RUTTEN, V. P.; VAN DIJK, B.; BERNADINA, W. E.; RUITENBERG, E. J. A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. **Tissue Antigens**, v.43, n.3, p.189-92. Mar, 1994a.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A. M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J. A.; RUITENBERG, E. J.; RUTTEN, V. P. Infection of a canine macrophage cell line with *leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Veterinary Parasitology**, v.92, n.3, p.181-9. Oct 1, 2000.

PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J.; RUTTEN, V. P.; GEBHARD, D.; DEL REAL G.; RUITENBERG, E. J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European journal of immunology**, v.25, n.6, p.1594-600. Jun, 1995.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL G.; RUITENBERG, E. J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v.62, n.1, p.229-35. Jan, 1994b.

POLI, A.; ABRAMO, F.; MANCIANTI, F.; NIGRO, M.; PIERI, S.; BIONDA, A. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**, v.57, n.4, p.444-52. 1991.

POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropica**, v.38, n.4, p.383-93. Dec, 1981.

PROUDFOOT L, NIKOLAEV AV, FENG GJ, WEI WQ, FERGUSON MA, BRIMACOMBE JS, LIEW FY. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania lipophosphoglycan* in murine macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.1;93(20):10984-9. 1996.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.5193-5197. 1990.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.1, p.68-75. Aug, 2006a.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; GUERRA, L. L.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, v.146, n.2, p.303-11. Nov, 2006b.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORREA-OLIVEIRA R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.112, n.3-4, p.102-16. Aug 15, 2006c.

RODRIGUES, C. A.; BATISTA, L. F.; TEIXEIRA, M. C.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, P. O.; DE SA OLIVEIRA, G. G.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce



infection in vitro. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.3-4, p.197-205. Feb 28, 2007.

RODRÍGUEZ-SOSA M, RIVERA-MONTOYA I, ESPINOZA A, ROMERO-GRIJALVA M, LÓPEZ-FLORES R, GONZÁLEZ J, TERRAZAS LI. Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. **Cell Immunol.** 242(2):61-71. Aug, 2006.

RODRIGUEZ-CORTES, A.; FERNANDEZ-BELLON, H.; RAMIS, A.; FERRER, L.; ALBEROLA, J.; SOLANO-GALLEGO, L. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.116, n.3-4, p.190-8. Apr 15, 2007.

ROLÃO N, CORTES S, GOMES-PEREIRA S, CAMPINO L. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Exp Parasitol.** Mar;115(3):270-6. 2007.

RONCAROLO, M. G.; GREGORI, S., BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R.; FLEISCHHAUER, K.; LEVINGS, M. K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunological Reviews**, v.212, p.28-50. Aug, 2006.

SACKS, D. L.; LAL, S. L.; SHRIVASTAVA, S. N.; BLACKWELL, J.; NEVA, F. A. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. **Journal of Immunology**, v.138, n.3, p.908-13. Feb 1, 1987.

SANCHEZ, M. A.; DIAZ, N. L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F. J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.70, n.6, p.618-24. Jun, 2004.

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.88, n.1-2, p.21-30. Sep 6, 2002.

SCHOPFER F. J.; BAKER P. R.; FREEMAN B. A. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? **Trends Biochem Sci**, v.28, p.646-654. 2003

SHARMA, S. K.; DUBE, A.; NADEEM, A.; KHAN, S.; SALEEM, I.; GARG, R.; MOHAMMAD, O. Non PC liposome entrapped promastigote antigens elicit parasite specific CD8+ and CD4+ T-cell immune response and protect hamsters against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.24, n.11, p.1800-10. Mar 10, 2006.

SHIBATA M.; ARAKI N.; HAMADA J.; SASAKI T.; SHIMAZU K.; FUKUUCHI Y. Brain nitrite production during global ischemia and reperfusion: an in vivo microdialysis study. **Brain Res**, v.734, p.86-90. 1996.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O.; BRAZIL R. P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n.3, p.285-91. Apr, 2001.

SILVA, J. G.; WERNECK, G. L.; CRUZ MDO, S.; COSTA, C. H.; DE MENDONÇA, I. L. Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* sp. in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v.23, n.7, p.1715-20. Jul, 2007.

SINGH, V. K.; MEHROTRA, S.; NARAYAN, P.; PANDEY, C. M.; AGARWAL, S. S.; Modulation of autoimmune diseases by nitric oxide. **Immunol. Res.**, v.22, n.1, p.1-19. 2000.

SINHA, P. K.; PANDEY, K.; BHATTACHARYA, S. K. Diagnosis & management of leishmania/HIV co-infection. **The Indian Journal of Medical Research**, v.121, n.4, p.407-14. Apr, 2005.

SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.24, n.4, p.247-54. Oct, 2001.

STAUBER, L. A. Leishmaniasis in the hamster. In: Cole, W.H. (Ed.), *Some Physiological Aspects and Consequence of Parasitism*. **Rugers University Press, New Brunswick**. p. 77-99. 1955.

STENGER, S.; DONHAUSER, N.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine**, v.183, n.4, p.1501-14. Apr 1, 1996.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.180, n.3, p.783-93. Sep 1, 1994.

STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.169, p.1543. 1989.

TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J.; MICHALICK, M. S.; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.38, n.2, p.81-9. Mar-Apr, 1996.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.96, n.3, p.203-12. Apr 2, 2001.

TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S.; DIAS, M.; GENARO, O.; LEITE, V. H.; BARBOSA, A. J.; BAMBIRRA, E. A.; DA COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MAYRINK, W. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.31, n.3, p.139-45. May-Jun, 1989.

TAKEDA, K.; KAISHO T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v.21, p.335-76. 2003.

TEIXEIRA, S. A.; CASTRO, G. M.; PAPES, F.; MARTINS, M. L.; ROGERIO, F.; LANGONE, F.; SANTOS, L. M.; ARRUDA, P.; DE NUCCI G.; MUSCARA, M. N. Expression and activity of nitric oxide synthase isoforms in rat brain during the development of experimental

allergic encephalomyelitis. **Brain Res Mol Brain Res**, v.99, n.1, p.17-25. Feb 28, 2002.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.52, n.3, p.287-92. Mar, 1995.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSÓRIO, Y. CANINE visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.64, n.3-4, p.119-24. Mar-Apr, 2001.

TRYPHONAS, L.; ZAWIDZKA, Z.; BERNARD, M. A.; JANZEN, E. A. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. **Can J Comp Med**, v.41, n.1, p.1-12. Jan, 1977.

TRZECIAK S.; CINEL I.; PHILLIP DELLINGER R.; SHAPIRO N. I.; ARNOLD R. C.; PARRILLO J. E.; HOLLENBERG S. M.; Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. **Acad Emerg Med**. V 15, n5, p. 399-413. May, 2008.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. **Parasite immunology**, v.25, n.11-12, p.569-79. Nov-Dec, 2003.

VOULDOUKIS, I.; DRAPIER, J. C.; NUSSLER, A. K.; TSELENTIS, Y.; DA SILVA, O. A.; GENTILINI, M.; MOSSALAYI, D. M.; MONJOUR, L.; DUGAS, B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob Agents Chemother**, v.40, n.1, p.253-6. Jan, 1996.

WALDECK, K.; NY, L.; PERSSON, K. E.; Mediators and mechanisms of relation in rabbit urethral smooth muscle. **Br. J. Pharmacol**. V.123, n.4, p. 617-624. 1998.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb Pathog**, v.38, n.4, Apr, p.147-60. 2005.

XU, D.; LIU, H.; KOMAI-KOMA, M.; CAMPBELL, C.; MCSHARRY, C.; ALEXANDER, J.; LIEW, F. Y. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. **Journal of Immunology**, v.170, n.1, p.394-9. Jan 1, 2003.

UNIVERSIDADE VALE DO RIO DOCE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fernando Rocha dos Santos

NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO E  
EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
INDUZÍVEL NO BAÇO DE CÃES  
NATURALMENTE INFECTADOS COM  
*Leishmania (Leishmania) chagasi*

Governador Valadares

2008

Santos, Fernando Rocha dos

Níveis séricos de óxido nítrico e expressão da óxido nítrico Sintase induzível no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* /, Fernando Rocha dos Santos. --2008.

82f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Vale do Rio Doce, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Governador Valadares, MG, 2008.

Orientador: Luiz Cosme Cotta Malaquias.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Óxido nítrico – Níveis Séricos. 3. Parasitologia. I. Malaquias, Luiz Cosme Cotta II. Universidade Vale do Rio Doce. III. Título.

CDD 636.089696



**Ata da Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado Intitulada:**

**“Níveis Séricos de Óxido Nítrico e Expressão da Óxido Nítrico Sintase Induzível no Baço de Cães Naturalmente Infectados com *Leishmania Chagasi*”**

Aos oito dias do mês de julho de 2008, às 14h, na sala 01 do edifício Pioneiros no *campus* Antônio Rodrigues Coelho da Universidade Vale do Rio Doce, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado do aluno Fernando Rocha dos Santos. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR O CANDIDATO.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias  
Presidente (UNIVALE)

Prof. Dr. Wanderson Geraldo Lima  
Examinador (UFOP)

Profa. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal  
Examinador (CPqRR)

**DATA DA DEFESA: 08/07/2008**



Reconhecida pelo parecer 16/92 CFE - Portaria 1037/92 MEC  
Fundação Percival Farquhar (Mantenedora)  
CNPJ: 20.611.810/0001-91

Campus I . Armando Vieira  
R. Moreira Sales, 850 - Bairro Vila Bretas  
Caixa Postal 295 . CEP: 35030-390  
Tel.: (33) 3279-5200 . FAX (33) 3279-5202

Campus II . Antônio Rodrigues Coelho  
R. Israel Pinheiro, 2000, Bairro Universitário  
Caixa Postal 295 . CEP: 35020-220  
Tel.: (33) 3279-5500 . FAX: (33) 3279-5042  
Governador Valadares - MG - Brasil  
Site: univale.br



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)