

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL



GIULIA DA SILVA LOPES

**Marcadores Fenotípicos Celulares de Cães
com Leishmaniose Visceral**

Brasília

2020

Marcadores Fenotípicos Celulares de Cães com Leishmaniose Visceral

GIULIA DA SILVA LOPES

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Cecília Beatriz Fiuza Favali

Co-orientadora: Dr^a Lívia Ribeiro Mendonça



Brasília

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

LL864m Lopes, Giulia da Silva
 Marcadores fenotípicos celulares de cães com leishmaniose
visceral / Giulia da Silva Lopes; orientador Cecília Beatriz
Fiuza Favali; co-orientador Livia Mendonça. -- Brasília,
2020.
 161 p.

 Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2020.

 1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Leucócitos caninos.
3. Moléculas de superfície. I. Favali, Cecília Beatriz
Fiuza, orient. II. Mendonça, Livia , co-orient. III. Título.

Giulia da Silva Lopes

Marcadores Fenotípicos Celulares de Cães com Leishmaniose Visceral

Universidade de Brasília

Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical

Data da defesa da dissertação

13 de fevereiro de 2020

Banca Examinadora

Profa. Dr^a Cecília Beatriz Fiuza Favali - Universidade de Brasília
(Presidente)

Flávia da Silva Nader Motta – Universidade de Brasília
(Membro Externo)

Fabiana Brandão Alves Silva – Universidade de Brasília
(Membro Interno)

Sarah de Athayde Couto Falcão – Universidade de Brasília
(Suplente)

Dedico este trabalho à Francisca, minha mãe e mulher mais inspiradora que conheço. Dedico ainda aos meus irmãos, companheiros da vida inteira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me presentear com o caminho e por todas as surpresas, desafios e presentes no decorrer deste. Agradeço pela generosidade, pelos sonhos realizados e por todos os aprendizados oferecidos até aqui.

À minha mãe, Francisca, honro sua coragem e agradeço por sonhar comigo, por amar incondicionalmente, por nos desejar livres e confiantes, pelos incentivos, pela parceria e por respeitar e vibrar com os caminhos que decidimos seguir. Ao meu pai, Marcelo, por me instigar a curiosidade, por amar, por vibrar com minhas vitórias e por me querer consciente das minhas potencialidades.

Aos meus irmãos, Ricardo e Thiago, por serem grandes parceiros de vida, sempre me quererem feliz e por me ensinarem sobre tolerância e empatia.

Aos meus avós por serem grandes inspirações, por sempre se fazerem presentes, por tornarem meus dias mais leves e divertidos, pelos ensinamentos fortes e engrandecedores.

Ao Thiago, agradeço pela parceria e amizade, pelo apoio no decorrer dessa caminhada, pela tranquilidade e positividade, sempre presentes, e pelo amor.

À Prof.^a Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali pela oportunidade, boa energia e confiança, por todas as experiências e conhecimentos compartilhadas, pelo apoio nos desafios e aventuras durante esse tempo e por nos incentivar a ter coragem.

Ao Lucas e à Elane, amados amigos e fundamentais nesse tempo, por todas as vivências e resistências dos últimos anos, pela boa energia, pela paciência, risadas, apoio, consolo e puxões de orelha. Obrigada por tornarem essa caminhada mais leve e alegre. Tenho sorte de tê-los na vida e desejo que nossos caminhos continuem unidos.

À Cleonice, pela parceria durante o mestrado, amizade, generosidade e por todas as trocas no decorrer dos processos de ensino e aprendizagem, por ser sempre presente.

À Lívia Mendonça pela parceria nesse trabalho e pelos ensinamentos.
À Sarah Falcão por nos ensinar a ensinar, pelo cuidado e apoio nos últimos anos. À Fabiana pelo cuidado e generosidade sempre presentes. Agradeço ainda ao Agnelo, pela sua prontidão em ajudar e paciência em ensinar.

Aos colegas do Laboratório Biologia do Gene por todo o tempo compartilhado e por gentilmente compartilharem conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins pela paciência, colaboração e prontidão em nos ajudar. Estendo meus agradecimentos aos alunos do seu laboratório. Agradeço ainda ao Prof. Dr. Wagner pela parceria em resoluções neste trabalho e à sua aluna Isabelle Luz pela ajuda preciosa.

Agradeço finalmente à Universidade de Brasília por mais uma chance de aprendizado em suas dependências e com seus professores e alunos. Agradeço ainda às agências de fomento Fundação de Apoio e Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por tornarem possível a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Status de endemidade da Leishmaniose Cutânea Localizada no mundo em 2016.....	20
Figura 2	Status de endemidade da Leishmaniose Visceral no mundo em 2016.....	21
Figura 3	Ciclo epidemiológico geral da Leishmaniose Visceral Canina	29
Figura 4	Ciclo de vida da <i>Leishmania infantum</i>	31
Figura 5	Patogênese após infecção por <i>Leishmania infantum</i> em cães.....	34
Figura 6	Resposta imune com direcionamento ao perfil de resistência ou de susceptibilidade à infecção por <i>Leishmania</i>	37
Figura 7	Biomarcadores dos perfis de resistência e susceptibilidade à LVC.....	40
Figura 8	Imagem representativa das células coletas após separação por gradiente de densidade com Ficoll.....	69
Figura 9	Imagem representativa da estratégia de análise para caracterização fenotípica de monócitos na etapa <i>Ex vivo</i>	71
Figura 10	Imagem representativa da estratégia de análise para caracterização fenotípica de linfócitos na etapa <i>Ex vivo</i>	72
Figura 11	Imagem representativa da estratégia de análise para caracterização de monócitos na etapa <i>In vitro</i>	74
Figura 12	Caracterização <i>Ex vivo</i> e Média de intensidade de fluorescência (MFI) de monócitos de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos.....	76
Figura 13	Caracterização <i>Ex vivo</i> e Média de intensidade de fluorescência (MFI) de linfócitos T e B de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos.....	78
Figura 14	Caracterização <i>Ex vivo</i> de linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos.....	80
Figura 15	Caracterização de morte celular de PBMCs em abordagem <i>ex vivo</i>	81

Figura 16	Caracterização de monócitos após estimulação <i>in vitro</i>	83
Figura 17	Média de intensidade de Fluorescência (MFI) das moléculas expressas na superfície celular de monócitos, em abordagem <i>in vitro</i>	85
Figura 18	Caracterização de linfócitos T e B após estimulação <i>in vitro</i> ..	87
Figura 19	Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de moléculas expressas em linfócitos T e B na abordagem <i>in vitro</i>	90
Figura 20	Caracterização das populações linfócitos TCD4+ e TCD8+ após estímulo <i>in vitro</i>	92
Figura 21	Caracterização de morte celular de PBMCs em abordagem <i>ex vivo</i>	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos monoclonais utilizados no estudo.....	63
Tabela 2	Composição dos “MIX”	64
Tabela 3	Grupos do estudo e frequência.....	66
Tabela 4	Sinais clínicos em 5 cães do Distrito Federal (DF).....	67
Tabela 5	Características fenotípicas e faixa etária.....	68
Tabela 6	Regiões administrativas de origem	68

LISTA DE ABREVIÇÕES

AMV	Vírus da mieloblastose aviária
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
DCs	Células Dendríticas
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPP	Teste cromatográfico de dupla plataforma
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
EIE	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Enzyme-linked Immunoorbent Assay
FSC	Forward scatter channel
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por alça
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MFI	Intensidade média de fluorescência
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NASBA	Ensaio baseado em sequência de ácido nucléico
NO	Óxido nítrico
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico

PCR	Reação em cadeia de polimerase
PI	Iodeto de propídeo
RA	Região administrativa
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBF	Soro bovino fetal
SLA	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
SSC	Side scatter channel
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR-DPP	Teste rápido cromatográfico de dupla plataforma

ÓRGÃOS FINANCIADORES

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Apoio e Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF)

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Doenças tropicais negligenciadas.....	17
1.2 Leishmanioses.....	19
1.3 Epidemiologia.....	20
1.4 Agentes etiológicos.....	25
1.5 Ciclo da doença.....	28
1.6 Sinais clínicos de LVC.....	31
1.7 Imunopatogenia da LVC.....	32
1.8 Diagnóstico.....	45
1.8.1 Métodos diretos.....	46
1.8.1.1 Microscopia.....	46
1.8.1.2 Histopatológico e Imuno-histoquímica.....	47
1.8.1.3 Cultura <i>In vitro</i>	47
1.8.2 Métodos indiretos.....	48
1.8.2.1 Molecular.....	48
1.8.2.2 Sorológico.....	49
1.9 Proteínas recombinantes.....	51
1.9.1 ADF/Cofilina.....	51
1.9.2 RAB1-GTPase.....	52
1.10 Controle e tratamento.....	52
2. JUSTIFICATIVA.....	54
3. OBJETIVOS.....	56
3.1 Objetivo Geral.....	56
3.2 Objetivos específicos.....	56
4. MÉTODOS.....	57
4.1 Desenho experimental.....	57
4.2 Cultura de <i>Leishmania infantum</i>	58
4.3 Obtenção do antígeno solúvel (SLA) de <i>Leishmania infantum</i>	58
4.4 Dosagem de SLA de <i>L.infantum</i> - Qubit™.....	59
4.5 Obtenção de antígenos recombinantes de <i>Leishmania infantum</i>	59

4.6 Grupos de estudo.....	60
4.7 Obtenção de PBMCs.....	60
4.8 Citocentrifugação.....	61
4.9 Cultura de células e estimulação - <i>in vitro</i>	62
4.10 Marcação para análise por citometria de fluxo.....	62
4.11 Detecção de morte celular em leucócitos.....	64
4.12 Aquisição e análise de dados da citometria de fluxo.....	65
4.13 Análise estatística.....	65
5. RESULTADOS.....	66
5.1 Características da amostra.....	66
5.2 Obtenção de PBMCs.....	69
5.3 Estratégia de análise - <i>ex vivo</i>	70
5.4 Estratégia de análise - <i>in vivo</i>	73
5.5 Caracterização fenotípica de monócitos - <i>ex vivo</i>	75
5.6 Caracterização fenotípica de linfócitos - <i>ex vivo</i>	77
5.7 Caracterização de morte celular em análise - <i>ex vivo</i>	80
5.8 Resposta de monócitos à reestimulação <i>In vitro</i> com antígenos derivados de <i>L. infantum</i>	82
5.9 Resposta de linfócitos à reestimulação <i>In vitro</i> com antígenos derivados de <i>L. infantum</i>	86
6. DISCUSSÃO.....	94
7. CONCLUSÃO.....	113
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
9. APÊNDICE.....	139
10. ANEXO.....	160

RESUMO

A Leishmaniose é uma zoonose, transmitida por vetor (gênero *Lutzomyia*), pertencente ao grupo de doenças tropicais negligenciadas. A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada a forma mais perigosa da doença, apresentando risco de morte quando não tratada. A LV acomete humanos e outras espécies de mamíferos, sendo o cão infectado considerado o principal reservatório doméstico do parasito. No Brasil, a leishmaniose visceral canina (LVC) é em geral causada pela espécie *L. infantum* e manifesta-se num amplo espectro clínico, desde a forma assintomática até a forma sintomática da doença, com intenso comprometimento de órgãos internos. Para o curso clínico da doença, a resposta imune celular tem um importante papel, porém, há poucos estudos caracterizando detalhadamente a expressão de moléculas de superfície em leucócitos caninos diferenciando sintomáticos de assintomáticos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de marcadores celulares fenotípicos em leucócitos de cães infectados, sintomáticos e assintomáticos. Neste trabalho, 15 cães do DF foram distribuídos em três grupos: cães não infectados (NI), cães infectados assintomáticos (IAS) e cães infectados sintomáticos (IS). Foram analisados em contexto *ex vivo*, os fenótipos celulares de monócitos (CD14⁺MHC-II⁺), linfócitos T (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, CD8⁺), linfócitos B (CD19⁺CD25⁺) e a viabilidade celular, em PBMCs. Adicionalmente, foi realizada a análise, *in vitro*, empregando-se antígenos de *L. infantum*, solúvel e recombinante (ADF/Cofilina e RAB1-GTPase), como tratamentos para as células citadas acima. Os resultados indicam menor frequência de monócitos (CD14⁺MHC-II⁺) circulantes, assim como baixa expressão de CD44 no grupo IS, sugerindo comprometimento da função de apresentação de antígenos em monócitos desse grupo. Ainda, a maior expressão de CD4 em linfócitos de cães IS em relação aos cães IAS é um resultado que deve ser melhor estudado para compreensão de seu impacto na resposta imune celular dos indivíduos IS. Na avaliação de morte celular demonstrou-se a modulação desta pelo parasito em cães com LVC, sugerindo sua utilização como estratégia de evasão do parasito ao sistema imune. Alguns biomarcadores baseados na expressão de moléculas e porcentagem de monócitos e linfócitos, descritos nesse estudo, podem ser utilizados para identificar o perfil de susceptibilidade ou resistência do hospedeiro. As proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho demandam estudos complementares para avaliação do seu potencial imunogênico e possível utilização em métodos diagnósticos.

Palavras chave: Leishmaniose visceral canina, leucócitos caninos, moléculas de superfície

ABSTRACT

Leishmaniasis is a vector-borne zoonosis, belonging to the group of neglected tropical diseases. Visceral Leishmaniasis (VL) is considered the most dangerous form of the disease, presenting a risk of death when left untreated. VL affects humans and other mammal species, being the infected dogs considered the main domestic reservoir of the parasite. In Brazil, Canine Visceral Leishmaniasis (LVC) is generally caused by the species *L. infantum*, and manifests a broad clinical spectrum, from asymptomatic to symptomatic form of the disease, with intense involvement of internal organs. For the clinical course of the disease, the cellular immune response has an important role, however, there are few studies characterizing in detail the expression of surface molecules in canine leukocytes, mainly differentiating symptomatic from asymptomatic. Therefore, the aim of this study was to characterize the percentage and phenotype of monocytes and lymphocytes of dogs with LVC, symptomatic and asymptomatic. In this study, 15 dogs from the Distrito Federal (Brazil), naturally infected, were distributed in three groups: uninfected dogs (NI), asymptomatic infected dogs (IAS) and symptomatic infected dogs (IS). Cellular phenotypes of monocytes (CD14 + MHC-II +) T lymphocytes (CD3 +, CD4 +, CD25 +, CD8 +), B lymphocytes (CD19 + CD25 +) and the induction of cell death by the parasite in PBMCs were analyzed, in an Ex vivo context. Additionally, the analysis *In vitro* was performed using antigens from *L. infantum*, soluble and recombinant (ADF/Cofilina and RAB1-GTPase), as treatments for the cells mentioned above. The results indicate a lower frequency of circulating monocytes (CD14 + MHC-II +), as well as low expression of CD44, in the IS group, suggesting that the function of antigen presentation in monocyte was compromised. Also, the higher expression of CD4 in lymphocytes of IS dogs compared to IAS dogs is a result that should be better studied to understand its impact on the cellular immune response of IS. In the evaluation of cell death, its modulation by the parasite was demonstrated in dogs with LVC, this strategy was used as to evade the immune system. Some biomarkers based on the expression of molecules and percentage of monocytes and lymphocytes, described in this study, can be used to identify the host's susceptibility or resistance profile. The recombinant proteins used in the study need to be better understood to identify their immunogenic potential and possible use in diagnostic methods.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis, canine leucocytes, surface molecules

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças tropicais negligenciadas

O conceito de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) foi cunhado há mais de uma década e se dispõe, de forma válida, a categorizar um grupo de doenças infecciosas que estão predominantemente associadas às populações mais pobres em ambientes tropicais e subtropicais ^(1,2). Em 2003, a Organização Mundial de Saúde (OMS) iniciou o movimento com o objetivo de controlar e eliminar as DTNs. As discussões se estenderam até o ano de 2007, quando então foi redigido o Plano global para o combate de doenças tropicais negligenciadas de 2008-2015 da OMS ⁽³⁾. Esses processos de identificação e categorização aumentaram a visibilidade de tais doenças infecciosas e possibilitaram a implementação de diversos programas ⁽⁴⁾.

As DTNs variam em relação às características biológicas e de transmissão e afetam mais de um bilhão de pessoas em 149 países ⁽⁵⁾ e são, predominantemente, reportadas em países mais pobres em que a população tem acesso limitado a serviços de saúde ⁽⁶⁾. A OMS reconhece 17 DTNs ^(5,7), sendo que 13 delas são causadas por infecções parasitárias (protozoários e helmintos) e por infecções bacterianas, representando as DTNs de maior relevância, com a maior quantidade de pessoas infectadas no mundo. As demais DTNs são causadas por vírus, algumas espécies de fungos e ectoparasitos. Há de se notar que doenças transmitidas por vetores, tais como arboviroses, leishmanioses, doença de Chagas e tripanossomíases podem resultar em alta mortalidade e morbidade nas regiões acometidas pelas mesmas ⁽⁶⁾.

Em maio de 2013, por conta da crescente expansão das DTNs, organizou-se a 66ª Assembléia Mundial de Saúde, em que os países membros da OMS concordaram em adotar a resolução WHA66.12,

relacionada ao investimento em ações em saúde para as DTNs e com projeções até 2030. Foram definidas então estratégias com objetivos claros para as 17 DTNs, conectando-as aos objetivos da OMS e incluindo-as na cobertura universal em saúde ⁽²⁾. As cinco estratégias recomendadas pela OMS são: quimioterapia preventiva, melhoria da água e saneamento, intensificação do tratamento de doenças e controle de vetores e medidas veterinárias de saúde pública para doenças zoonóticas negligenciadas ^(3,8,9). Tais estratégias estão atreladas ao conceito de saúde unificada, a qual propõe uma mudança cultural no que diz respeito ao reconhecimento da conexão entre animais, humanos e o ecossistema, evidenciando a importância dessa abordagem no controle de doenças zoonóticas e na melhoria em termos de equilíbrio ambiental ⁽²⁾.

A movimentação no sentido de lidar com as DTNs foi impulsionada por empresas farmacêuticas, que se comprometeram em doar os medicamentos que estão na lista da OMS como essenciais e avaliados no valor de bilhões de dólares. Assim como pelo apoio de ONGs na implementação de programas relacionados ao tratamento e prevenção de DTNs em países endêmicos; apoio de países como os EUA e os do Reino Unido e aumento do comprometimento dos próprios países endêmicos em investir em melhorias em termos de saúde pública ⁽⁵⁾.

Apesar do investimento em DTNs estar entre os maiores na área de saúde, apenas 0,6% deles são efetivamente empregados no desenvolvimento da assistência em saúde para as DTNs, o que afeta mais de um bilhão de pessoas ⁽⁷⁾ e evidencia a má distribuição do dinheiro investido. Ainda assim, muitos avanços foram alcançados em 10 das 17 DTNs em direção aos objetivos acordados, entre elas destacam-se a filariose, hanseníase e esquistossomose ⁽²⁾. No ano de 2015, as DTNs foram adicionadas aos alvos em saúde dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)⁽¹⁰⁾ e o Fundo Global se comprometeu a financiar iniciativas e priorizar ações para o combate das DTNs⁽¹¹⁾. Essa conquista é positiva e pode impactar as populações mais expostas às DTNs.

A leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas,

mencionadas anteriormente, considerada uma zoonose de importância na saúde pública no Brasil. Tal doença se desenvolve em uma dinâmica complexa que relaciona fatores ambientais, biológicos e ecológicos que permitem a interação entre o vetor e o hospedeiro além de fatores socioeconômicos, como a pobreza e a falta de recursos em saúde ^(1,2).

A leishmaniose está associada à desigualdade populacional, em termos econômicos e culturais, à má nutrição da população, ao sistema imune comprometido ou não competente, residências e áreas peri domiciliares precárias e falta de recursos ⁽¹²⁾. Há ainda de se contar os fenômenos naturais e condições ambientais criadas pelos seres humanos que facilitam a propagação da doença e dificultam os esforços para controlá-la ⁽⁴⁾. A situação desta doença ainda apresenta pouca melhora no contexto mundial e requer ainda estudos e investimento, tanto em prevenção quanto em diagnósticos e tratamento.

1.2 Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças, que apresentam diferentes manifestações, desenvolvimento e sintomatologia, e que são causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* ^(13,14).

As doenças se dividem em duas formas principais: leishmaniose tegumentar americana (LTA), a qual subdivide-se em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD), e leishmaniose visceral (LV) ^(13,14), a depender da espécie envolvida na infecção e a patogênese da doença.

As leishmanioses são causadas por um grupo de protozoários pertencentes a mais de 20 espécies de *Leishmania*. Tais protozoários são transmitidos aos seres humanos e a outros mamíferos por meio do repasto sanguíneo de uma das 90 espécies de flebotomíneos mundialmente relacionadas à transmissão desses protozoários ⁽¹⁵⁾.

1.3 Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) a leishmaniose, em humanos, apresenta ampla distribuição mundial, ocorrendo na Ásia, África, Oriente Médio, Europa e nas Américas. Estima-se a incidência de aproximadamente 900.000 a 1,3 milhões de novos casos e 30.000 mortes pela doença anualmente. A OMS relata que dos 200 países que se reportaram a ela no ano de 2018, 97 países foram considerados endêmicos, sendo 68 deles endêmicos para ambos LV e LCL, 21 são endêmicos somente para LCL (Figura 1) e 8 somente para LV (Figura 2) ⁽¹²⁾.

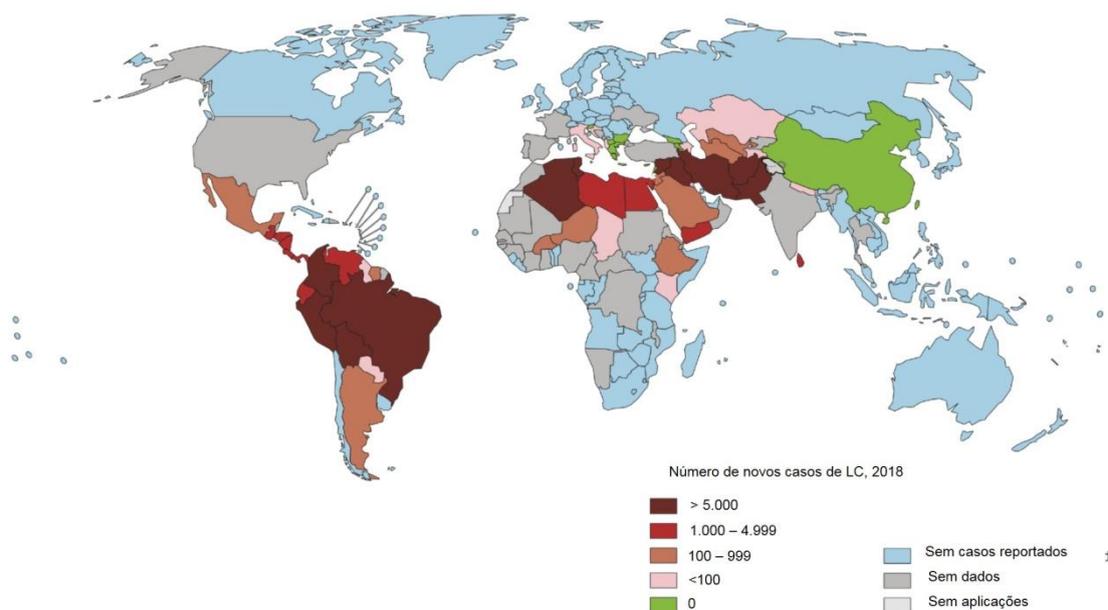


Figura 1. **Status de endemicidade da Leishmaniose Cutânea Localizada no mundo em 2016** (Adaptado de WHO, 2019).

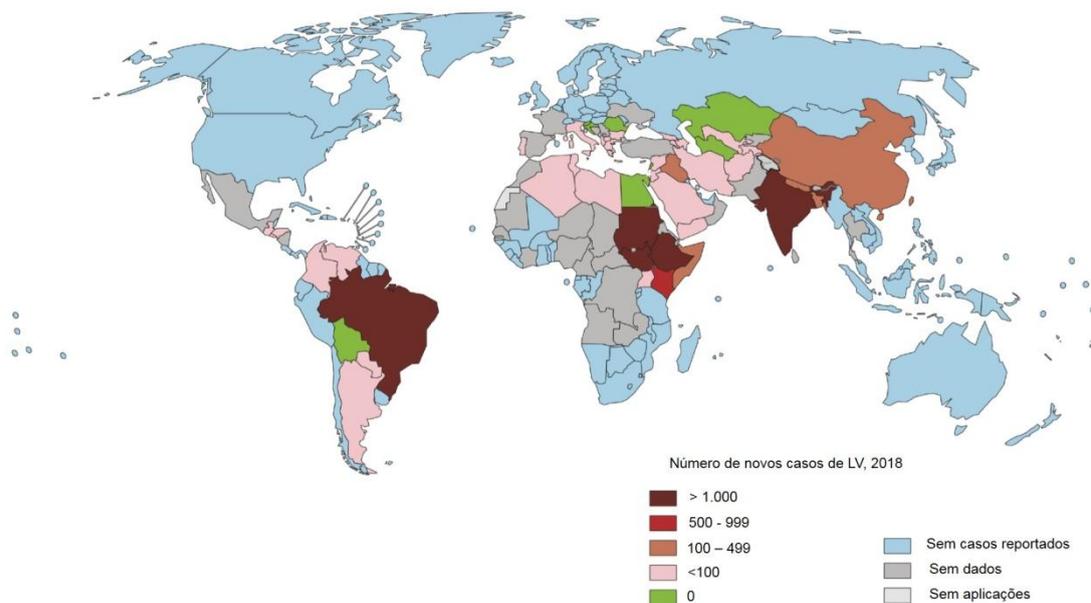


Figura 2. **Status de endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo em 2016** (Adaptado de WHO, 2019).

Em dezembro de 2019 foram apresentados à OMS dados epidemiológicos de alguns países a respeito do ano de 2018. Apenas 52 países endêmicos para LV, correspondendo a 68% do total, e 59 países endêmicos para LCL, correspondendo a 66% do total enviaram os dados de 2018 à OMS. Um total de 11 países reportou mais de 5.000 casos de LCL no ano de 2018, representando 88% da incidência global da doença, são eles: Argélia, Colômbia, Iraque, Peru, Paquistão, Afeganistão, Brasil, Bolívia, República Islâmica do Iran, República Árabe da Síria e Tunísia. Foram ainda reportados 1.039 casos de LCL importados. Ainda neste ano, 90% dos casos de LV, foram reportados somente em sete países, são eles: Brasil, Índia, Somália, Etiópia, Quênia, Sudão e Sudão do Sul. Foram reportados 140 casos de LV globalmente, sendo que Uganda reportou quase 50% deles ⁽¹²⁾.

A forma visceral da leishmaniose é conhecida por causar uma alta taxa de letalidade se não tratada no decorrer de aproximadamente dois anos ⁽⁵⁾, e ainda que tratada de forma adequada, ela pode apresentar taxa de letalidade de aproximadamente 5% ⁽¹⁶⁾. Nas Américas, 12 países

apresentam casos de LV em humanos, sendo 11 deles endêmicos para a doença. No período compreendido entre os anos de 2001 a 2015, foram reportados 52.176 casos de LV em humanos nas Américas e, dentro da classificação do cenário epidemiológico, o Brasil se encaixa no grupo dos países com a transmissão em expansão ⁽¹⁷⁾. As Américas reportaram ainda 15% de todos os novos casos de LV em 2015, totalizando 3.559 casos ⁽¹⁸⁾. Na América Latina, aproximadamente, 97% dos casos relatados de LV em humanos acontecem no Brasil, nas últimas três décadas foram registrados mais de 70.000 casos da doença, desses mais de 3.800 pessoas morreram ⁽¹⁹⁾ e a incidência de novos casos de LV aumenta anualmente, com sua letalidade chegando a 10% ⁽²⁰⁾.

No Brasil, a leishmaniose visceral vem sendo relatada desde 1913 ⁽²¹⁾ e atualmente é descrita em vários municípios brasileiros, sendo que aproximadamente 1.600 destes apresentam transmissão autóctone. A doença se distribuiu em todas as regiões brasileiras, inclusive na região sul ⁽¹⁶⁾, e o número de casos da doença cresceu significativamente nas últimas três décadas ⁽²²⁾.

Inicialmente, a doença estava relacionada a ambientes rurais e periferias de grandes cidades, onde o nível socioeconômico era baixo e as condições sanitárias precárias. A migração para os grandes centros urbanos foi recente, principalmente em estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste, em que a leishmaniose visceral encontra-se urbanizada ⁽²³⁾ sendo sua consolidação em áreas urbanas datada da década de 1980 ⁽²⁴⁾. O número de casos de leishmaniose visceral em humanos no Brasil em 2017 foi de 4.511. Mas os casos se distribuíram diferentemente em cada região do país, sendo 2.266 casos na região nordeste, 853 casos na região norte, 272 casos na região centro-oeste, 1.100 casos na região sudeste e 20 casos na região sul ⁽²⁵⁾.

Em Brasília (DF), a LV foi descrita como endêmica no ano de 2010, com casos autóctones confirmados entre humanos ⁽²⁶⁾. No Distrito Federal, foram reportados 23 casos de leishmaniose visceral humana no ano de 2017 distribuídos em seu território ⁽²⁷⁾.

A leishmaniose visceral pode ainda manifestar-se em outras espécies de mamíferos, classificada como uma zoonose, sendo os cães domésticos considerados os principais reservatórios naturais da doença no ciclo doméstico ⁽²⁸⁾. Além disso, os cães são reconhecidos como a causa mais importante da rápida distribuição da doença entre humanos e outros cães nas áreas endêmicas ⁽²⁹⁾.

A infecção canina tem precedido, então, a ocorrência de casos humanos e a prevalência da doença tem sido maior em cães do que em humanos e, nesse caso, é chamada de leishmaniose visceral canina (LVC) ⁽³⁰⁾. Há ainda os reservatórios selvagens que dificultam a eliminação da doença ⁽⁴⁾. Por ser uma doença transmitida por vetores, os desequilíbrios ambientais, a estrutura precária das cidades e ajuntamentos e o aquecimento global dificultam o controle do vetor e promovem a disseminação e persistência da leishmaniose ^(4,31).

Por consequência dos grandes deslocamentos populacionais recentes e das mudanças climáticas, surtos de LV e LCL em humanos têm sido relatados. Exemplos recentes dessa situação ocorreram no Sudão do Sul e no Oriente Médio ^(32,33). Isso acontece porque a população que ainda não foi exposta entra em contato com os vetores infectados ou quando indivíduos infectados entram em contato com vetores competentes que ainda não estavam infectados ⁽⁴⁾. Os casos autóctones também cresceram em países como Áustria e Alemanha ⁽³⁴⁻³⁶⁾, e em novos locais na América Latina ^(37,38). Por isso, a LVC é considerada uma doença de importância veterinária, ambiental e também de saúde pública ⁽¹⁵⁾.

Dessa forma é necessário pensar em resoluções em termos de saúde segundo o conceito de Saúde Unificada (One Health). O conceito de Saúde Unificada é definido como um esforço integrado de cooperação entre profissionais especializados em saúde humana, em saúde animal e em saúde ambiental, em níveis locais e globais, de modo a assegurar saúde para os três grupos e encorajar parcerias, políticas públicas, programas e pesquisas ⁽³⁹⁾. Tais profissionais devem trabalhar em ramos variados, como: saúde pública, medicina humana, medicina veterinária, planejamento urbano

e ciências ambientais. O objetivo é que o foco seja em abordagens holísticas integradas que possam englobar questões de saúde humana, saúde animal e saúde ambiental e criar acesso ao entendimento dos impactos em saúde e suas soluções ⁽⁴⁰⁾.

O conceito de Saúde Unificada começou com base no conceito de medicina comparada, na qual entendia-se não haver uma linha que separava a medicina animal da medicina humana ⁽⁴¹⁾. Um dos estudos pioneiros em medicina comparativa foi feito por Vicq d'Azyr, que relacionou em seus estudos sobre a peste bovina, no século XVIII, a epidemia em humanos e em animais às condições geográficas e climáticas locais ⁽⁴²⁾. Posteriormente, ela passou a ser chamada de Medicina Única e, após a inclusão da saúde ambiental, chamou para uma abordagem interdisciplinar e foi nomeada como Saúde Unificada ⁽⁴¹⁾. Atualmente, aproximadamente 61% dos organismos que infectam humanos são zoonóticos ⁽⁴³⁾, sendo a leishmaniose uma delas.

Com a identificação da leishmaniose e de várias outras doenças zoonóticas, é necessário que todo o sistema de saúde seja pensado em torno do conceito de Saúde Unificada ⁽⁴¹⁾, o que nos remete ao estudo da LVC com o intuito de diminuir os casos de infecção tanto em cães quanto em humanos.

A LVC está distribuída em mais de 50 países da África, Ásia, Europa e das Américas ⁽⁴⁴⁾. Em áreas endêmicas, estima-se que 90 a 95% dos cães estão clinicamente saudáveis e apenas 5 a 10% apresentam os sinais clínicos da doença. Mas, dentre os cães clinicamente saudáveis, 2/3 estão infectados e 1/3 não estão infectados ⁽⁴⁵⁾. Segundo dados do Ministério da Saúde, o Brasil responde por 90% dos casos de LVC na América Latina. Há relatos de casos de LVC em todas as regiões do Brasil, inclusive na região sul ^(46,47). No estado de Goiás, os casos de LVC foram reportados no período de 2007 a 2015, em vários municípios ⁽⁴⁸⁾.

Em Brasília (DF), um estudo realizado entre Janeiro e Outubro de 2013 apresentou um levantamento de dados do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade no qual 6.413 cães foram testados. Destes,

foram confirmados 590 cães infectados, o que corresponde a 9,2% de todos os cães examinados ⁽⁴⁹⁾. Esse estudo ainda reportou casos de LVC confirmados nas seguintes regiões: Àguas Claras, Lago Norte, Lago Sul, Paranoá, Santa Maria, Sobradinho I e II, Taguatinga, Vicente Pires, Vila Planalto, Varjão, Fercal, Guará I e II, Riacho Fundo I e II, Brasília, Brazlândia, Candangolândia, Estrutural, Gama, Itapoã, Ceilândia, Recanto das Emas, Planaltina, Samambaia, Jardim Botânico, São Sebastião, Núcleo Bandeirante e Park Way ⁽⁴⁹⁾. Há ainda uma alta prevalência de LVC nas regiões peri urbanas do DF ⁽⁵⁰⁾.

Tendo em vista que há uma relação diretamente proporcional de casos de LVC e infecção por *L. infantum* em humanos, já bem descrita na literatura ^(28,44,51,52), é de suma importância o estudo da LVC com o intuito de diminuir os casos de infecção tanto em cães quanto em humanos no Brasil.

1.4 Agentes etiológicos

A leishmaniose é uma doença antiga, os primeiros relatos em humanos foram encontrados em escritos antigos que datam de 2.500 a. c. e, posteriormente, foram corroborados após análises, por métodos moleculares, de materiais arqueológicos ⁽¹³⁾. Achados arqueológicos sugerem que a primeira espécie de *Leishmania* deve ter se originado no Mesozóico (251- 65,5 milhões de anos), ainda antes da separação da Gondwana ⁽⁵³⁾. O primeiro fóssil encontrado, no interior do intestino do flebotomíneo da espécie *P. burmis* preservado em âmbar, data do Cretáceo (100 milhões de anos), sendo da espécie *Paleoleishmania proterus* ⁽⁵⁴⁾.

A *Leishmania* é geralmente transmitida por vetores, e há indícios da transmissão desses parasitos para vertebrados mesmo antes do surgimento dos mamíferos, que ocorreu no Paleoceno. Dessa forma é possível perceber que os atuais vetores da *Leishmania* já haviam surgido e já interagiam com ela, mesmo antes do surgimento dos mamíferos.

Porém, achados fósseis sugerem que a leishmaniose se estabeleceu de fato durante o Paleoceno (60 a 31 milhões de anos), quando então já existia o parasito, o vetor e o reservatório interagindo entre si ⁽¹³⁾. Tais fatos demonstram a longa co-evolução desses grupos e suas respectivas espécies, a depender do local.

Somente em 1901, Leishman identificou organismos que ele reconheceu serem similares a tripanossomas, em amostras do fígado de um paciente diagnosticado com a febre dum-dum, na Índia. No mesmo ano, Donovan confirmou a presença do que foi chamado de corpos de Leishman-Donovan em pacientes indiano e, então, foi feita a primeira conexão dos corpos de Leishman-Donovan a casos de kala azar (como era nomeada a leishmaniose visceral). Em 1903, Ross sugeriu que tais corpos de Leishman-Donovan fossem chamados de *Leishmania donovani*, dando origem ao primeiro nome de uma espécie de *Leishmania*. Já em 1905, foi feita a primeira identificação de leishmaniose transmitida por flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* por Sargent e colaboradores. Em 1908, de uma criança com leishmaniose visceral foi coletada uma espécie de *Leishmania* que foi, posteriormente, nomeada de *Leishmania infantum* por Nicolle, sendo identificada uma segunda espécie causadora de leishmaniose visceral, ou kala azar. No mesmo ano, Nicolle e Comple identificaram parasitos de *Leishmania* em cães infectados ⁽¹³⁾.

Em 1977, já havia um consenso sobre o gênero *Leishmania*, mas não sobre os demais níveis de classificação filogenética, então, Garderner sugeriu que fosse feita a taxonomia do gênero *Leishmania* que incluísse nomenclatura, classificação e sinônimos das principais espécies. Então, em 1987, Lainson e Shaw dividiram o gênero *Leishmania* em dois subgêneros. O primeiro seria *Leishmania*, para aquelas espécies que apresentam o desenvolvimento completo no interior do piloro do flebotomíneo, e *Viannia* para aquelas espécies que se desenvolvem parte do tempo no intestino médio e parte no piloro. Mais recentemente, achados moleculares sugeriram a criação de suas seções que

categorizam os subgêneros e suas espécies. A primeira seção seria Euleishmania, compreendendo os subgêneros *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e complexo *L. emietti*, sendo que apenas as espécies dos dois primeiros são patogênicas para humanos. A segunda seção seria Paraleishmania, compreendendo *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis*, *L. colombensis* e o subgênero *Endotrypanum*. Apenas a *L. colombiensis* é patogênica para humanos. No total, são 53 espécies de *Leishmania*, sendo que 20 delas são patogênicas para humanos ⁽¹³⁾.

Os agentes etiológicos causadores da Leishmaniose Visceral são protozoários tripanossomatídeos, pertencentes ao reino Protista, classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, subfamília Leishmaniinae e gênero *Leishmania* ^(13,30) pertencentes ao complexo de espécies *Leishmania donovani* (*L. donovani*, *L. archibaldi* e *L. infantum*) ⁽²³⁾. A espécie *L. donovani* costuma ser encontrada no Velho Mundo, enquanto que a espécie *L. infantum*, no Novo e no Velho Mundo ⁽⁵⁵⁾. Inicialmente, a *L. infantum* no Novo Mundo era chamada de *L. chagasi* e considerada uma espécie à parte, posteriormente, verificou-se que a *L. infantum* e a *L. chagasi* são indistinguíveis, e então manteve-se a nomenclatura *L. infantum* tanto para a do Novo Mundo quanto para a do Velho Mundo ⁽⁵⁶⁾.

No Brasil, essa doença é uma zoonose comumente causada pela espécie *Leishmania infantum* e é transmitida principalmente por fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Mais recentemente, as espécies *Lutzomyia evansi* e a *Lutzomyia cruzi* foram também identificadas como vetores da LV ^(57,58). Os estudos de Galvis-Ovallos e colaboradores demonstram que a alta taxa de sobrevivência e a possível baixa dispersão dos vetores estão relacionadas às condições locais ideais para o estabelecimento do vetor nas áreas peri domiciliares, tanto urbanas quanto rurais ⁽¹⁾.

São conhecidas atualmente mais de 800 espécies de

flebotomíneos, sendo 375 encontradas no Novo Mundo e 464 no Velho Mundo ⁽¹³⁾. Eles pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae ⁽¹³⁾. A classificação mais atualizada de flebotomíneos apresenta seis gêneros, são eles: *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warileya*, *Phlebotomus*, *Chinus* e *Sargentomyia*. As três primeiras são encontradas no Novo Mundo e as três últimas no Velho Mundo ⁽¹³⁾. No Velho Mundo, o gênero *Phlebotomus* compreende todas as espécies de flebotomíneos que transmitem LV e LC ⁽¹³⁾.

No Novo mundo, o maior gênero é o *Lutzomyia*, compreendendo aproximadamente 434 espécies e vários subgêneros. As espécies consideradas vetores de leishmaniose pertencem a três subgêneros, são eles: *Nyssomyia*, *Psychodopygus* e *Lutzomyia*. O gênero que apresenta maior diversidade, maior dispersão e maior importância médica na América do Sul e em zonas tropicais é o *Lutzomyia*. Os flebotomíneos surgiram antes dos hospedeiros mamíferos da *Leishmania*, sua origem data entre as eras Paleozóica e Mesozóica (250 milhões de anos) ⁽⁵⁹⁾, então sua história evolutiva com *Leishmania* e, posteriormente, com mamíferos é longa. Compreender tais relações evolutivas entre os três grupos é de suma importância para traçar estratégias de controle da doença ⁽¹³⁾.

1.5 Ciclo da doença

A transmissão da doença é descrita em dois ciclos distintos do parasito *L. infantum*. O ciclo silvestre é mantido por duas espécies de raposas selvagens (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), duas espécies de marsupias (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) e cinco espécies de roedores (*Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, *Trichomys apereoides*, *Proechimys canicollis*, *Coendu prehensilis*) ⁽⁶⁰⁾. Já no ciclo doméstico, no

qual o reservatório da doença é o cão (*Canis familiaris*) (Figura 3) ^(21,58). Segundo Laison e Rangel ⁽⁵⁸⁾, em ambos os ciclos, o homem é considerado um hospedeiro acidental pelo fato da infecção humana ainda não apresentar a capacidade de manter o ciclo de transmissão do parasita. Foram ainda identificadas outras formas de infecção, são elas: por injeção de drogas com materiais contaminados transfusão de sangue, infecção congênita e transmissão sexual ^(51,60). As últimas duas foram reportadas na Índia e no leste africano, apresentando transmissão entre humanos ⁽²⁸⁾.

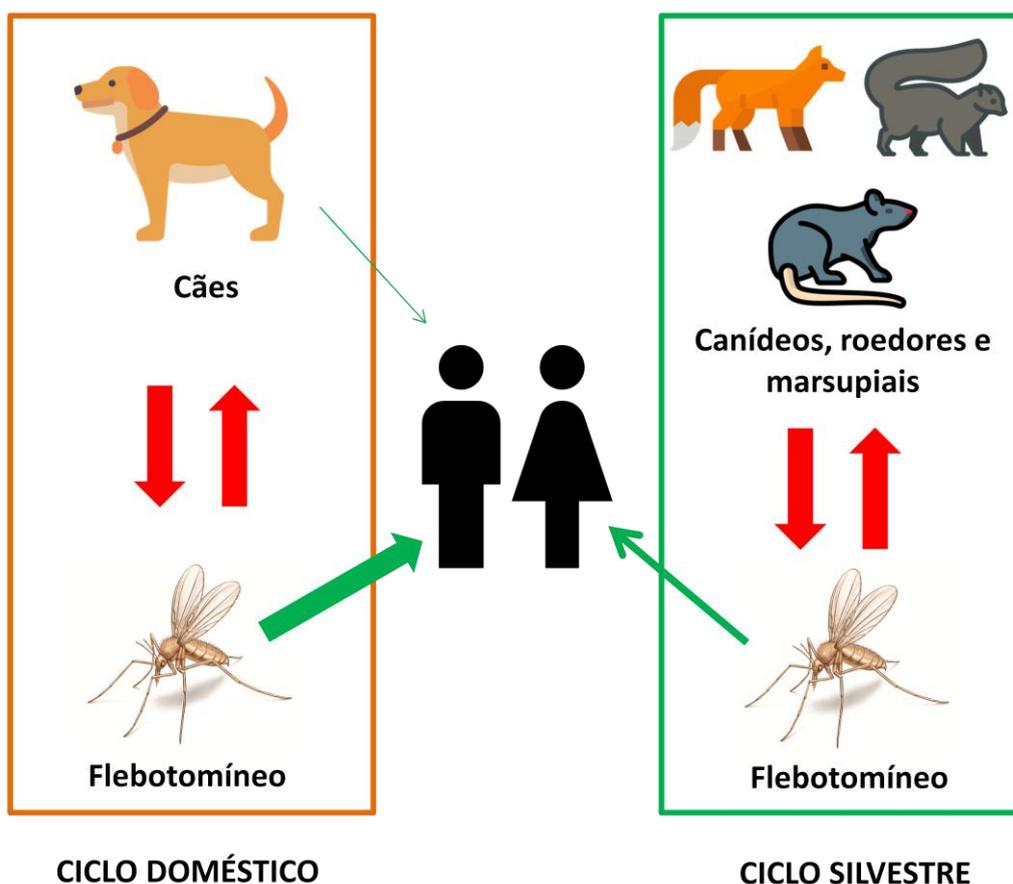


Figura 3. **Ciclo epidemiológico geral da Leishmaniose Visceral Canina.** O ciclo doméstico está representado à esquerda e compreende o reservatório doméstico mais comum, os cães. Estes podem transmitir o parasita aos humanos em casos raros. Durante o repasto sanguíneo, o parasita é transmitido do hospedeiro mamífero para flebotomíneo, que por sua vez pode transmitir o parasita ao humano e outros cães, sendo essa a principal forma de infecção em humanos. O ciclo silvestre, representado à direita, compreende os reservatórios silvestres: canídeos, roedores e marsupiais. Estes

reservatórios podem transmitir o parasito para o flebotomíneo, que se torna um vetor apto a transmitir o parasito ao humano e a outros mamíferos reservatórios. No entanto este ciclo não é a via mais bem descrita de transmissão da *Leishmania* a humanos. Infecções dentro dos ciclos (setas vermelhas) e infecções de humanos (setas verdes) (Adaptado de Gharbi, 2015).

O ciclo da doença se inicia quando a fêmea se alimenta, sugando o sangue de mamíferos infectados e ingerindo a forma amastigota da *Leishmania* em macrófagos parasitados. No trato digestivo, o parasito diferencia-se rapidamente em promastigota, que é sua forma flagelada (30,44).

Posteriormente, as promastigotas se transformam em paramastigotas, migram e se fixam no esôfago e na garganta do vetor, quando se diferenciam em promastigotas metacíclicas, sua forma mais infectante. Quando as fêmeas sugam novamente o sangue de um hospedeiro vertebrado, o vetor regurgita saliva durante o repasto sanguíneo e libera por meio dela os parasitos em sua fase mais infectiva. Já na epiderme do hospedeiro as células mononucleares fagocitárias do sistema imune inato fagocitam os parasitos. No interior dos macrófagos ou das células dendríticas (DC), os parasitos se diferenciam em amastigotas novamente e iniciam a reprodução até que rompam essas células e infectem novas DCs e macrófagos. O que ocorre em seguida é a disseminação via circulação sanguínea principalmente para tecidos e órgãos ricos em macrófagos e DCs, como medula óssea, fígado, linfonodos, baço e na derme, dando continuidade ao ciclo (Figura 4) (30,44).

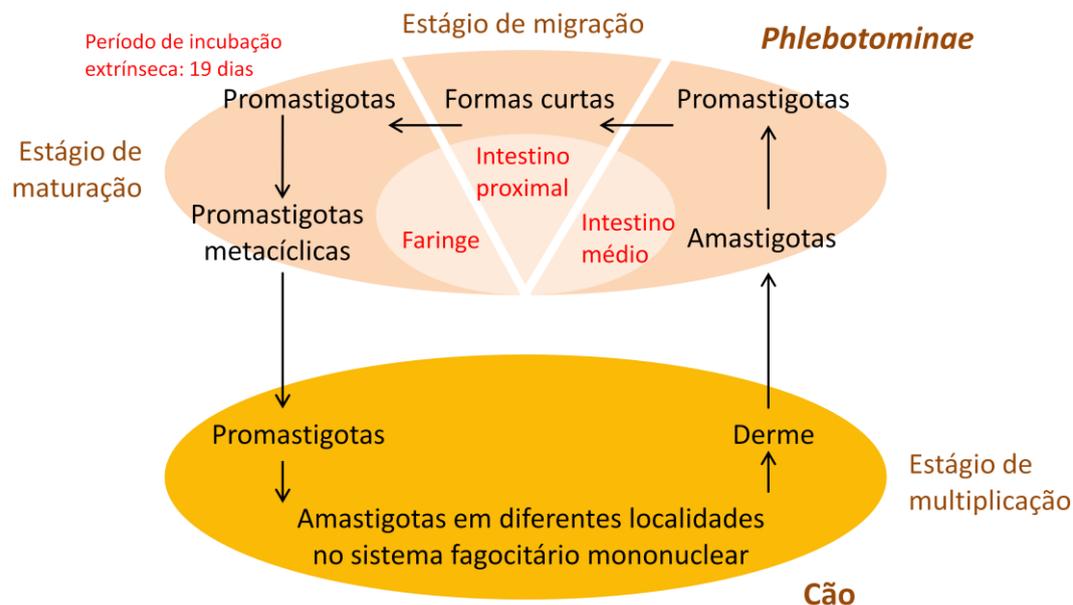


Figura 4. **Ciclo de vida da *Leishmania infantum*.** A *Leishmania infantum* infecta o vetor após o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingerindo macrófagos infectados. No interior do intestino médio, as amastigotas se transformam em promastigotas e iniciam o estágio de migração. Migram inicialmente para o intestino proximal na sua forma curta e, posteriormente, para a faringe onde transformam-se em promastigotas metacíclicas, durante o estágio de maturação. Posteriormente, após o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero, é feita a inoculação do parasito na derme do novo hospedeiro, reiniciando o ciclo (Adaptado de Gharbi, 2015).

1.6 Sinais clínicos de LVC

A infecção pode resultar em animais assintomáticos que aparentam ser saudáveis e aqueles sintomáticos em estágios mais graves da doença⁽²²⁾. Estima-se até que o número de cães infectados seja muito maior que o número de casos clínicos reportados⁽⁴⁴⁾. E, em geral, a LVC é uma doença crônica e multissistêmica, pois a *L. infantum* é capaz de infectar praticamente todos os tecidos e órgãos do hospedeiro⁽⁴⁴⁾. Os sinais clínicos de LVC começam com uma lesão no local da inoculação do parasito, sendo uma lesão ulcerativa que regride em um número variável

de dias e se inicia, então, o período silencioso da infecção ⁽⁴⁴⁾. A expressão clínica da doença começa com progressão lenta e, posteriormente, pode ganhar severidade. Os sinais clínicos iniciais da doença são: dermatite nasal e periorbital, linfadenomegalia, poliartrite, perda de peso, hemorragias intestinais, diarreias, apatia, febre, hepatoesplenomegalia, úlceras cutâneas, hiperqueratose e ceratoconjuntivite ⁽⁶¹⁾. Posteriormente, com o agravamento da doença, podem aparecer os sinais mais característicos, como neuralgia, parestesia, aplasia da medula óssea, onicogribose, alopecia generalizada, sinais de insuficiência renal (poliúria, polidipsia e vômito), ou alterações renais com azotemia e glomerulonefrite, ulceração por todo o corpo, inanição e caquexia ⁽⁶¹⁻⁶³⁾.

Há indícios de que cães domésticos representem o maior reservatório em áreas urbanas ^(58,64), mesmo aqueles infectados assintomáticos são considerados reservatórios e têm papel ativo na perpetuação da transmissão de *L. infantum* ⁽⁶⁵⁾. De acordo com Belo e colaboradores, ainda há discussões a esse respeito, mas, ao menos nas Américas, uma meta-análise sugere que proprietários de cães infectados, sintomáticos e assintomáticos, devem estar sob alto risco de infecção ⁽⁶⁶⁾. Gharbi e colaboradores discutem que gatos também podem apresentar sinais clínicos de LV, mas seu papel como reservatório ainda não foi muito bem compreendido ⁽⁴⁴⁾.

1.7 Imunopatogenia da LV e LVC

Os parasitos do gênero *Leishmania* desencadeiam respostas imunes distintas no hospedeiro, o que influencia na patogênese da doença. Acredita-se que as diferentes manifestações da doença sejam decorrentes de mecanismos multifatoriais que relacionam aspectos

referentes ao parasito e ao hospedeiro vertebrado. O principal fator relacionado ao hospedeiro é o perfil de resposta imune desenvolvido por este quando infectado. No decorrer da infecção por *L. infantum*, o indivíduo fica exposto a uma variedade complexa de antígenos derivados do protozoário e, assim, são estimulados diferentes mecanismos de resposta imune celular e humoral. Para que se compreenda melhor a patogênese da doença e sua variação entre indivíduos, é preciso relacionar fatores ligados ao padrão dos mecanismos imunopatológicos e de proteção, com o desenvolvimento e a manutenção das formas clínicas variadas da leishmaniose visceral. Ainda, pouco se sabe sobre tais mecanismos e sobre os fatores relacionados a eles ⁽⁶⁷⁾.

Após a inoculação do parasito, alguns cenários podem ser observados. No primeiro, os parasitos podem ser eliminados localmente, levando a uma infecção autolimitada. Os parasitos também podem se manter restritos aos linfonodos regionais, causando uma infecção localizada, podendo ou não apresentar sintomas. Por último, os parasitos podem se disseminar por todo o organismo, inclusive nos órgãos internos, podendo ou não serem observados os sinais clínicos (Figura 5). Na LVC, a espécie comumente causadora da infecção no Brasil é a *Leishmania infantum*, que costuma apresentar o último cenário em hospedeiros caninos. Tais cenários variam a depender da espécie de *Leishmania* e de suas características específicas, como fatores de virulência e tropismo. Além disso, podem variar de acordo com o hospedeiro, dependendo de sua composição genética, resposta imune mediada por célula, resposta humoral, citocinas presentes no local da infecção e doenças concomitantes ⁽⁶⁸⁾.

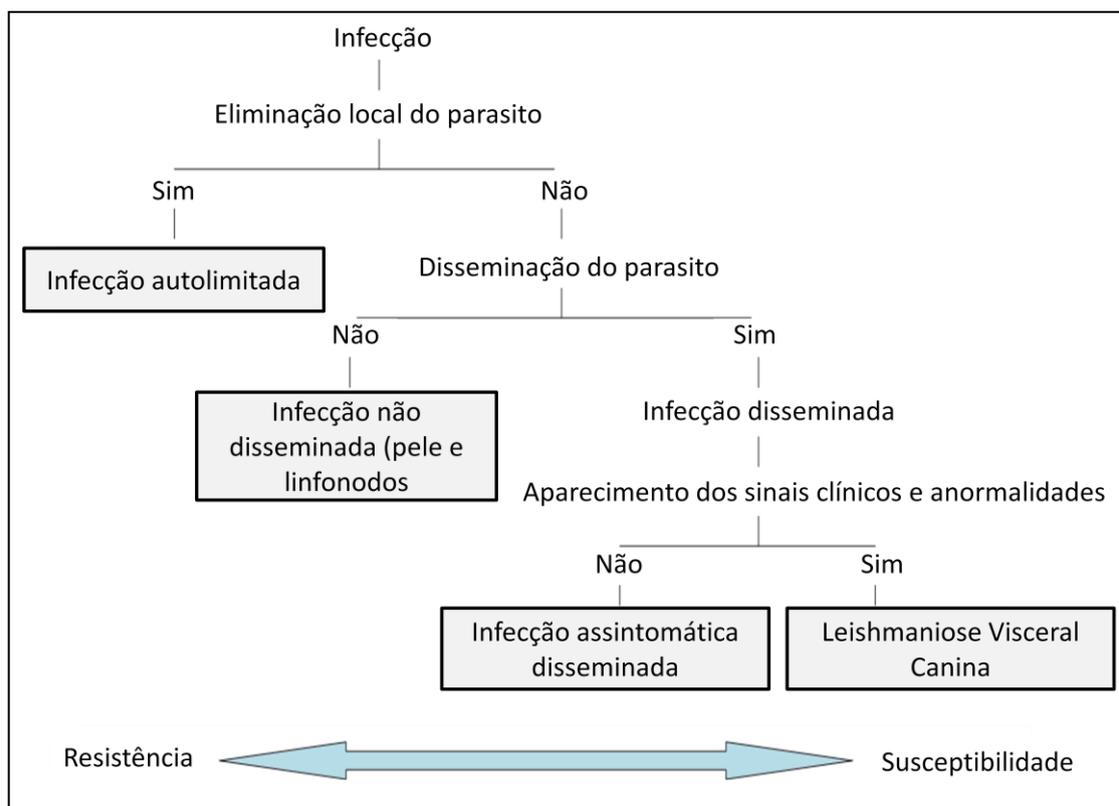


Figura 5: **Patogênese após infecção por *Leishmania infantum* em cães** (adaptado de Saridomichelakis, 2009). Após a infecção, se houver eliminação local do parasito, a infecção será autolimitada. No caso do parasito não ser eliminado, pode não haver disseminação do parasito, causando uma infecção localizada. Se houver disseminação do parasito, este causará a infecção disseminada que pode levar a uma infecção assintomática ou a LVC, sintomática. O perfil de resistência está relacionado à capacidade de eliminar ou controlar a infecção, enquanto o perfil de susceptibilidade, à incapacidade de controlar a infecção.

Por serem parasitos intracelulares obrigatórios, a *Leishmania* pode infectar diversas células de vários tecidos e órgãos de cães, incluindo tecidos do Sistema Nervoso Central. Algumas células descritas por serem infectadas pelo parasito são fagocitos mononucleares, hepatócitos células endoteliais, eosinófilos e neutrófilos. Porém, a *Leishmania* infecta, se multiplica e sobrevive preferencialmente em células fagocitárias mononucleares, ou seja, monócitos, macrófagos e células dendríticas,

consideradas células hospedeiras ⁽⁶⁸⁾.

Após a infecção, os neutrófilos são as primeiras células imunológicas a migrarem para o local da infecção. Elas têm a capacidade de fagocitar e eliminar os parasitos, porém alguns estudos relatam a capacidade do parasito de modular a resposta do neutrófilo e de sobreviver em compartimentos não líticos destes, atrasando a morte celular programada dessas células e prolongando seu tempo de vida ^(69,70).

Este fenômeno pode favorecer a infecção das células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente macrófagos e células dendríticas (DCs), pois há mais tempo para que as APCs cheguem ao local da infecção em número suficiente. Além disso, os neutrófilos apoptóticos são capazes de secretar substâncias quimiotáticas que recrutam macrófagos e DCs, que por sua vez fagocitam os neutrófilos infectados. Após a fagocitose, os macrófagos infectados começam a secretar citocinas antiinflamatórias como o fator de crescimento tumoral (TGF- β), que juntamente com as interleucinas (IL) IL-10 e concentração baixa de IL-12 no local da infecção, podem causar uma infecção silenciosa de DCs e macrófagos ^(71,72). Essa estratégia de infecção silenciosa é chamada de “Cavalo de Tróia” e impede o início efetivo da resposta imune adaptativa ⁽⁷¹⁾. O mesmo processo foi identificado em cães após a infecção ⁽⁷³⁾.

Após a internalização (Figura 6A), as amastigotas residem no interior dos fagolisossomos da célula hospedeira (Figura 6B), pois são adaptadas a sobreviverem a esse ambiente, resistindo à digestão e se multiplicando por meio de fissão binária. Durante essa etapa, os parasitos são capazes de inibir a apoptose de DCs e macrófagos até que eles possam se multiplicar o suficiente para lisar a célula e continuar a infecção de células adjacentes, permitindo a disseminação do parasito no organismo do indivíduo hospedeiro ⁽⁷¹⁾.

Por ser um parasito intracelular, a resposta imune ideal seria a

mediada por células, permitindo a resistência do hospedeiro à infecção. A ativação dos macrófagos e DCs representa um dos primeiros eventos na ativação da resposta inata à infecção intracelular ⁽⁷⁴⁾. As DCs e macrófagos têm a função de processar e apresentar os antígenos do parasito para as células T efetoras por meio das moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) que apresenta duas classes, sendo chamadas de MHC de classe I (MHC-I) e MHC de classe II (MHC-II) ⁽⁶⁸⁾. Esse processo marca o início da resposta imune adaptativa do hospedeiro. A imunidade inata apresenta um papel importante, tanto na proteção contra o parasito quanto na iniciação da resposta imune adaptativa, que pode controlar a infecção por *Leishmania*, ainda que não haja uma resposta pré existente específica para o antígeno ⁽⁷⁵⁾.

A resposta imune adaptativa contra a *Leishmania spp.* é dependente de linfócitos T e B, principalmente dos linfócitos T auxiliares do tipo I (Th1), referentes à ativação da resposta imune protetora inflamatória, perfil de resistência ⁽⁷⁴⁾. Ainda assim, os linfócitos T CD8+ são essenciais, pois são capazes de lisar as células infectadas e proporcionar a diminuição da carga parasitária ⁽⁶⁸⁾. O controle e resistência à infecção por *L. infantum*, com o desenvolvimento da resposta Th1, é caracterizado pela ativação de linfócitos T CD4+ (ativando as funções efetoras e de memória) por APCs. Além disso, há uma alta produção de citocinas do perfil Th1, como o interferon gama (IFN- γ) e IL-2, produzidos pelos linfócitos T CD4+, IL-12 e TNF- α que ativam a resposta leshmanicida em APCs infectadas, aumentam a eficiência fagocítica de linfócitos citotóxicos e levam à eliminação do parasito (Figura 6D) ^(68,74).

Estudos relatam que a resolução efetiva da infecção por *Leishmania*, perfil de resistência, depende que a imunidade do hospedeiro seja capaz de construir uma resposta com uma quantidade ideal de linfócitos T, seguida por ativação de macrófagos mediada por citocinas derivadas de células T ⁽⁷⁶⁾. Porém, a resposta imune protetora exacerbada pode causar lesões teciduais, o que constitui o paradoxo característico da

doença e contribui para a patogênese desta ⁽⁷⁷⁾.

A resposta imune que caracteriza a suscetibilidade à infecção é realizada por células e citocinas pertencentes ao perfil Th2, um perfil antiinflamatório. Nesse cenário, há a ativação de linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2) e há maior expressão de citocinas antiinflamatórias, como TGF- β , IL-4, IL-10, IL-5, IL-13 (Figura 6E) ⁽⁷⁸⁾. Desse modo, a ineficácia na ativação da imunidade mediada por células, permite a reprodução do parasito e disseminação pelo corpo do hospedeiro de forma descontrolada. Mas, ambos os perfis Th1 e Th2 estão, em geral, presentes no hospedeiro. O balanço entre os dois perfis depende de cada hospedeiro e de sua carga genética, mas os que respondem com o perfil Th1 estão mais aptos a resistir à infecção que os que apresentam o perfil Th2 majoritariamente ⁽⁶⁸⁾.

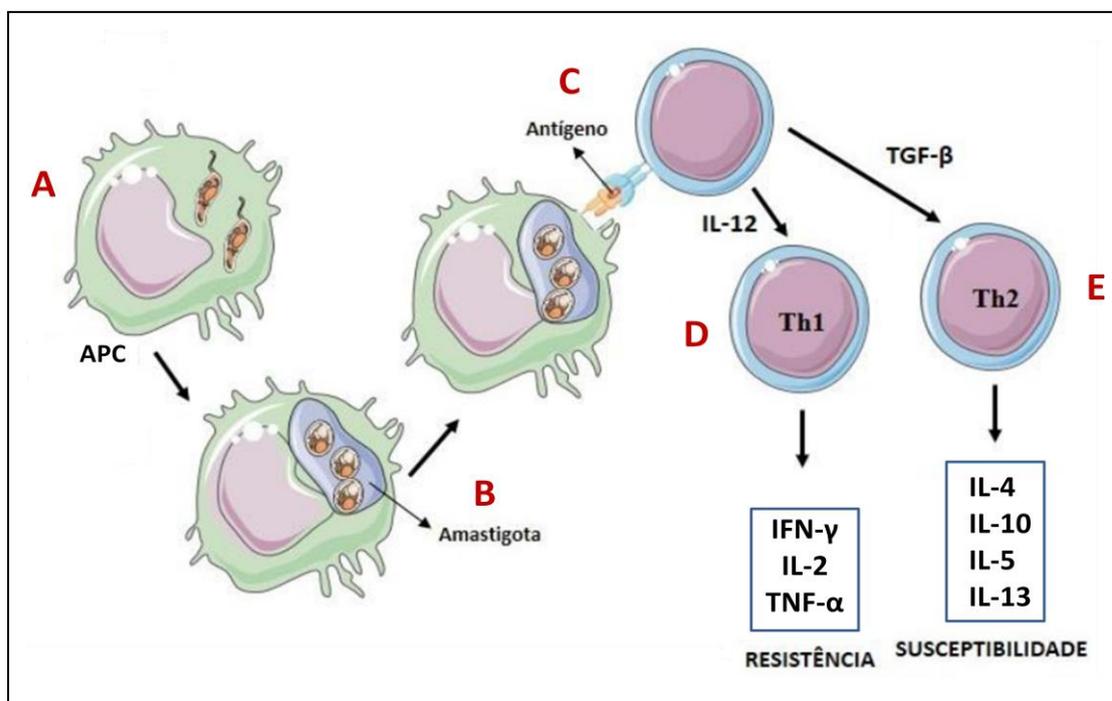


Figura 6. **Resposta imune com direcionamento ao perfil de resistência ou de susceptibilidade à infecção por *Leishmania*.** (A) A célula apresentadora de antígeno (APC) fagocita a *Leishmania* na forma promastigota, (B) que transforma-se na forma amastigota no fagolisossomo da APC, (C) que por sua vez faz a apresentação do antígeno

da *Leishmania* ao linfócito. Após a apresentação, a resposta imune pode seguir com a liberação de IL-12 polarizando a resposta para um perfil Th1 (D), com a expressão das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF, promovendo a resistência à infecção. Podendo ainda seguir com a liberação de TGF- β , polarizando a resposta para um perfil Th2 (E), com a secreção de IL-4, IL-10, IL-5 e IL-3, promovendo a susceptibilidade à infecção (Adaptado de Trajano-Silva, 2017).

O perfil Th17, por sua vez, vem sendo bastante relacionado à resposta imune após infecção com *Leishmania mexicana* e outras espécies ⁽⁷⁹⁾. As células Th17 produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-17F, IL-22 e IL-21), essa é uma resposta com perfil inflamatório e apresenta ação efetora diferente, a depender do patógeno ⁽⁸⁰⁾. A citocina IL-17 é uma potente ativadora de neutrófilos, relacionada à proliferação e recrutamento dessas células ⁽⁸¹⁾. Desse modo, a quantidade de células Th17 e neutrófilos crescem concomitantemente, e o alto nível dessas células está relacionado às lesões inflamatórias crônicas em camundongos BALB/c após infecção com *Leishmania mexicana*, linhagem suscetível à infecção. Já na fase mais tardia da infecção, contribuem para a suscetibilidade desse indivíduo, direcionando à um desenvolvimento progressivo da doença. Já na linhagem de camundongos C57BL/6, resistente à infecção, tal padrão de resposta imune controla o desenvolvimento do perfil Th17, de modo que esse controle pode estar relacionado ao perfil de resistência dessa linhagem ⁽⁷⁹⁾.

A ativação da imunidade mediada por célula pode causar a ativação de linfócitos B e a produção exacerbada de imunoglobulinas. As imunoglobulinas são anticorpos que em geral não são efetivos no combate dos parasitos intracelulares, e já são produzidos antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos da doença. A principal classe de imunoglobulina presente é a IgG, mas também são encontradas IgE, IgM e IgA, com menor concentração. Alta concentração de anticorpos na circulação pode causar a formação e deposição de imunocomplexos, e esses estão associados à diminuição da atividade fagocitária, causando a inflamação local via ativação do sistema complemento. Há ainda a

produção de anticorpos contra células musculares, sanguíneas e alguns componentes do núcleo celular levando a inflamação em alguns tecidos. Em ambos os casos, há uma associação dessas respostas à presença e severidade dos sinais clínicos da doença, como a poliartrite, alopecia, dermatite nasal e periorbital e ulcerações no corpo. Os cães resistentes e assintomáticos também produzem os anticorpos, porém em menor proporção ⁽⁶⁸⁾.

Há alterações clínico-patológicas comuns na doença, como a anemia, que pode ser uma consequência de infecção na medula óssea, induzindo a inflamação, o que pode interferir na produção de eritrócitos ⁽⁸²⁾. Em cães assintomáticos, pode acontecer a linfocitose. Em casos mais graves, pode haver linfopenia, eosinopenia, monocitopenia e trombocitopenia ^(45,83). Altos níveis de creatinina sérica e uréia podem ser identificados, em decorrência da deposição de imunocomplexos nos glomérulos que podem causar inflamação e, portanto, a glomerulonefrite ⁽⁸⁴⁾. Ainda, há o aumento dos níveis de proteínas plasmáticas, por conta do aumento da produção de imunoglobulinas, o que também é considerado uma alteração comum na LVC ^(45,85).

Foram descritos biomarcadores relativos aos perfis de susceptibilidade e resistência em cães com LVC. Para o perfil de susceptibilidade (sintomáticos), foi descrita a diminuição de parâmetros hematológicos, com diminuição de heritrócitos, linfócitos, eosinófilos e plaquetas. Ainda, o aumento de anticorpos circulantes, assim como aumento na concentração de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, entre outras) e diminuição da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , entre outras) e de IL-2, relativas à proliferação de linfócitos T. Os marcadores de ativação de metabolismo oxidativo, como o oxido nítrico (ON) também costumam apresentar diminuição. Há ainda alterações de parâmetros bioquímicos em cães com perfil de susceptibilidade (sintomáticos), como: hiperproteinemia, hipoalbuminemia, aumento da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina,

uréia, e níveis de creatinina. Esses biomarcadores apresentam alterações diretamente relacionadas ao desenvolvimento dos sinais clínicos observados em cães com perfil de susceptibilidade. Quanto aos cães com perfil de resistência (assintomáticos), observa-se parâmetros (hematológicos e bioquímicos) muito similares aos cães não infectados, assim como os níveis de citocinas pró e anti inflamatórias e IL-2, concentração de anticorpos circulantes e níveis de NO, relacionados à ativação do metabolismo oxidativo. Desse modo, cães com perfil de resistência tendem a não desenvolver os sinais clínicos da doença, enquanto a resposta imune do indivíduo se mantiver efetiva no controle da infecção e eliminação do parasito ⁽⁸⁶⁾.

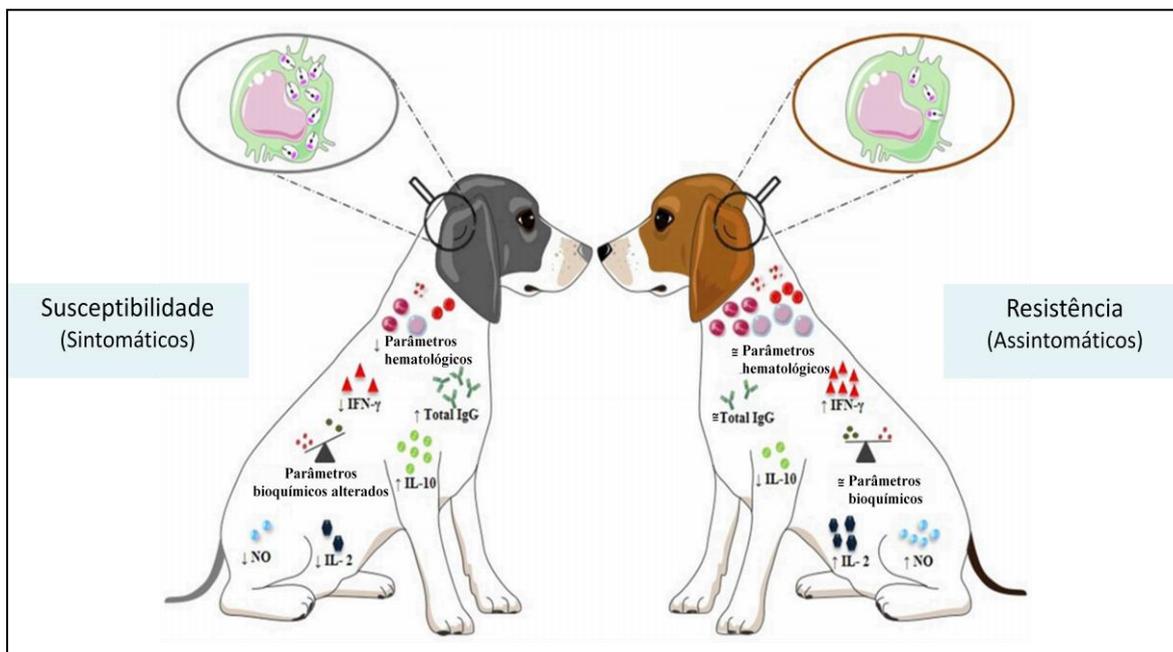


Figura 7. **Biomarcadores dos perfis de resistência ou de susceptibilidade à LVC.** Os biomarcadores da leishmaniose visceral canina estão relacionados à suscetibilidade ou resistência. As setas (↑ e ↓) indicam a diminuição ou o aumento dos níveis de cada biomarcadores; ≅: níveis aproximadamente normais; Parâmetros hematológicos: diminuição de heritrócitos, linfócitos, eosinófilos e plaquetas; Parâmetros bioquímicos alterados: hiperproteinemia, hipoalbuminemia, aumento da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, uréia, e níveis de creatinina (Adaptado de Maia-Gonçalves, 2019).

Em casos de LV em humanos é possível observar que, diferentemente de casos de LC, apesar da presença de antígenos de *Leishmania* no organismo do hospedeiro, este não é capaz de montar uma resposta imune celular anti-*Leishmania* adequada ^(87,88). Observou-se uma baixa sensibilidade em testes de hipersensibilidade na pele de pacientes com LV, retomando a responsividade após o tratamento ⁽⁸⁹⁾. Esse fato também se evidencia em testes *in vitro*, mesmo estimulando as células com antígeno solúvel de *Leishmania*, observou-se a ausência de proliferação de linfócitos e baixa secreção de IL-12 e IFN- γ em cultura ⁽⁸⁷⁾. Tais achados sugerem anergia específica dos linfócitos T de pacientes com LV. Tal anergia deve estar relacionada à polarização para resposta Th2 após infecção, com baixa presença de IFN- γ e alta presença de IL-10 ⁽⁹⁰⁾.

A ativação da resposta imune eficiente em cães depende ainda de células apresentadoras de antígenos, entre elas as células mononucleares fagocitárias (monócitos, DCs e macrófagos) e de linfócitos ⁽⁹¹⁾, ou seja, dos leucócitos. Portanto, é necessário que haja um somatório das moléculas sinalizadoras, receptores de superfície celular de APCs e moléculas de superfície de linfócitos T (CD4+ e CD8+) e B, para que haja a ativação eficiente da resposta imune em cães. Para analisar a resposta celular em amostras de PBMC total em cães, alguns receptores de superfície celular são comumente marcados para caracterização de subpopulações celulares.

Os linfócitos T são células da imunidade que interagem com as APCs e estão ativamente envolvidos na fase efetora da resposta imune, podendo ainda apresentar funções regulatórias. A atividade específica de cada linfócito é identificada por sua composição de moléculas CD (grupos de diferenciação) presentes em sua superfície. Em cães, os linfócitos apresentam a molécula CD3, que é uma molécula relacionada à transmissão de sinais intracelulares de ativação ⁽⁹²⁾, o que determina o reconhecimento, pelos linfócitos, de antígenos apresentados por APCs ⁽⁹³⁾.

Nas células T CD4, as moléculas CD4 estão presentes, e são relacionadas à promoção e indução da resposta imune celular e humoral ⁽⁹³⁾.

No caso da resposta imune celular, os linfócitos T CD4+ estão relacionados à indução de diferenciação e ativação de linfócitos T CD8+, que apresentam a molécula de superfície CD8 com propriedades citotóxicas ⁽⁹²⁾. Há ainda uma subpopulação de células T regulatórias (Treg) que são caracterizadas pela presença de moléculas, entre elas, CD4 e CD25, molécula relacionada à sinalização de proliferação ⁽⁹⁴⁾, e estão associadas à função de regular as respostas Th1 e Th2 ⁽⁹²⁾.

As diferentes populações de linfócitos podem ainda ser classificadas como de memória ou efetoras. Na identificação de células T de memória observa-se a expressão das moléculas CD44^{low} e CD45RO^{high}, já para identificação de células T ativadas efetoras observam-se CD44^{high} e CD45RO^{high} ⁽⁹⁵⁾. Além disso, alta expressão de CD25 e MHC-II e baixa expressão da molécula CD62L, ligante de lectinas, indicam populações de células T efetoras ou de memória ⁽⁹⁶⁾. Já a molécula CD44 é um receptor de hialuronato, presente em linfócitos T maduros, em monócitos e células B ⁽⁹⁷⁾.

Os linfócitos B são responsáveis pela produção de imunoglobulinas e esta produção é indicadora de ativação da resposta humoral, estabelecimento e manutenção de tolerância e memória ⁽⁹²⁾. Células B imaturas são em geral caracterizadas pela expressão de moléculas CD19. Essa molécula forma um complexo com a molécula CD21, que em conjunto iniciam a cascata de reações que promove a transdução de sinais no linfócito B. Há indícios de que o complexo CD19-CD21 atua na regulação da resposta que controla a resposta imune humoral de células B. Ambas são usadas como marcadores de caracterização fenotípica de linfócitos B ⁽⁹⁸⁾.

Já para monócitos, as moléculas de caracterização fenotípica são CD14, MHC-II e CD11b expressas em alta quantidade ^(78,99,100). A molécula

CD14 é considerada como marcador comum de monócitos em humanos e em muitas outras espécies, incluindo cães ⁽¹⁰¹⁾. Além disso, um receptor envolvido em vias de ativação celular, o MHC II, e a molécula CD4 são expressos na superfície dos monócitos do sangue periférico de cães em proporções variáveis ⁽¹⁰²⁾. Há indícios de heterogeneidade de subgrupos de monócitos caninos a depender da proporção de expressão dessas moléculas, sugerindo que a função de cada subgrupo é diferente. Os subgrupos categorizados de acordo com a variação da expressão de MHC-II e de CD4 são: MHC-II⁺CD4⁻ (Mo1), MHC-II⁺CD4⁺ (Mo2), MHC-II⁻CD4⁻ (Mo3). Os subgrupos Mo2 e Mo3 apresentam menor porcentagem destas moléculas que Mo1, mas produzem mais espécies reativas de oxigênio (ROS), que são compostos associados à fagocitose e eliminação de parasitos intracelulares ⁽¹⁰³⁾.

Há também receptores de vias de inibição celular, como o CD279 (Programmed Cell Death-1 – PD-1), uma molécula da família B7-CD28, em linfócitos e seus ligantes CD274 (PD-L1) e CD273 (PD-L2), expressa em monócitos, DCs, macrófagos e células B ⁽¹⁰⁴⁾. Tais moléculas regulam a ativação e proliferação de linfócitos, podendo causar a anergia de linfócitos ⁽¹⁰⁴⁾. Estudos com cães infectados com Li mostraram que após a infecção tanto o receptor PD-1, em linfócitos T e B, quanto seus ligantes, em monócitos, são mais expressos em cães com LVC que em cães saudáveis ^(104,105). Observaram ainda que o bloqueio de PD-1 podia restaurar a resposta proliferativa de linfócitos. Concluindo então que a infecção com Li modula a expressão dessas moléculas e consequentemente a resposta de linfócitos à infecção ⁽¹⁰⁴⁾.

Há ainda marcadores que podem detectar morte celular em leucócitos, como a Anexina V, que é uma proteína que se liga à fosfatidilserina, que por sua vez é um resíduo encontrado no interior da membrana citoplasmática de células saudáveis. Quando há o processo de apoptose dessas células, esse resíduo é externalizado, ainda na fase inicial da apoptose, sinalizando que a célula deve ser fagocitada ⁽¹⁰⁶⁾. A

AnexinaV é utilizada então para caracterização de apoptose inicial. Já o iodeto de Propídeo (PI), é um fluorocromo, que é capaz de se ligar e marcar DNA, possibilitando a detecção da morte celular por conta da fragmentação do DNA, liberação do conteúdo nuclear e permeabilização da célula principalmente em fases mais avançadas da apoptose ou na necrose ⁽¹⁰⁷⁾. A marcação somente com PI sinaliza morte por necrose e a dupla marcação com Anexina V e PI sinaliza morte celular por apoptose na fase tardia ^(106,107).

A *Leishmania* é capaz de modular a morte celular de leucócitos, após infecção. Em DCs humanas, a *Leishmania infantum* foi capaz de inibir a morte por apoptose dessas células, utilizando esse prolongamento da vida da DC como um mecanismo de evasão da resposta imune ⁽¹⁰⁸⁾. O mesmo foi descrito em macrófagos humanos, pois observou-se que as promastigotas de Li, por meio do lipofosfoglicano (LPG) que esta forma apresenta e libera no meio, inibem a apoptose de macrófagos, permitindo a sobrevivência e replicação do parasito ⁽¹⁰⁹⁾. Em monócitos e linfócitos humanos, de pacientes com LV aguda, foi observado um alto nível de apoptose, quando em comparação com pacientes saudáveis ⁽¹¹⁰⁾. Já em linfócitos de cães com LVC, foi observado que a alta expressão das moléculas PD-1 e seus ligantes, envolvidos na regulação da ativação de linfócitos T, podendo causar anergia e até a apoptose de linfócitos T, regulando ainda a produção de TNF- α , IL-4 e óxido nítrico (NO) ⁽¹⁰⁵⁾.

A imunofenotipagem da membrana celular de cães infectados, sintomáticos e assintomáticos ainda é pouco caracterizada. Sendo assim, pouco se sabe sobre o padrão de resposta imune celular desenvolvida em leucócitos caninos de indivíduos naturalmente infectados que apresentam manifestações clínicas e, daqueles que não as apresentam, e suas diferenças. Em humanos, observa-se na forma sintomática da doença um comprometimento funcional dos monócitos, com baixa expressão de moléculas de ativação e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, estabelecendo um estado de anergia, com baixa ativação de

linfócitos T CD4+, linfócitos B e ativação de linfócitos T CD8+, o que favorece a manutenção do parasito no organismo e potencial dano tecidual. Já na forma assintomática da doença, os indivíduos apresentaram o perfil de resposta imune preservada, com o perfil fenotípico celular similar ao observado em indivíduos não infectados ⁽⁶⁷⁾.

Dessa forma, é necessário que se compreenda as modulações provocadas pelos antígenos, provenientes da infecção por *L. infantum*, em células caninas apresentadoras de antígeno e em linfócitos, com seus respectivos marcadores fenotípicos. Além disso, compreender a ativação de leucócitos estimulados por antígenos de *L. infantum*, solúveis e recombinantes, pode contribuir com a escolha de abordagens terapêuticas mais adequadas para o controle da infecção e com o desenvolvimento de marcadores de prognósticos e métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos do que os atualmente utilizados.

1.8 Diagnóstico

O diagnóstico de LVC é complexo, pois não raramente, mesmo em cães sintomáticos, observa-se que os sinais clínicos são bastante variáveis e comuns a outras doenças. Além disso, há uma alta taxa de cães infectados assintomáticos ou com manifestações sub-clínicas. O diagnóstico clínico é de baixa sensibilidade na identificação em casos de cães assintomáticos ^(45,111,112). Ainda, existem as comorbidades que podem mascarar sinais clínicos. Por isso LVC é diagnosticada por meio de uma combinação de achados clínicos, testes sorológicos e parasitológicos ^(30,113). Para tanto, é necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos que sejam específicos, sensíveis, que sejam de fácil acesso, de simples execução e fácil interpretação, que não requeiram grandes estruturas e investimentos em equipamentos laboratoriais e profissionais,

principalmente em locais mais precários e distantes ^(114,115).

Os métodos diagnósticos utilizados na identificação de LVC variam desde uma avaliação clínica a diagnósticos laboratoriais até testes parasitológicos, moleculares e sorológicos. Alguns deles são classificados como diagnósticos diretos, nos quais há a identificação direta do parasito ou de seu material genético, outros são classificados como indiretos, que são testes imunológicos nos quais se identificam anticorpos ou antígenos específicos de *Leishmania* spp ^(112,116,117). Porém, todos os métodos diagnósticos possuem limitações importantes em termos práticos de aplicação ou em termos de acurácia. É importante observar então que cada um possui valores diferentes de sensibilidade e de especificidade, e que a demanda de materiais e equipamentos varia de acordo com o método diagnóstico escolhido.

1.8.1 Métodos diretos

1.8.1.1 Microscopia

A microscopia é um teste parasitológico no qual o material coletado de medula óssea, pele, linfonodos, baço ou sangue periférico é fixado em uma lâmina, sendo então corados com diversos métodos de coloração como o kit Panótico, com Giemsa ou Wright e analisados em microscópio óptico ⁽¹¹⁸⁾. Se forem identificadas amastigotas livres ou no interior de células fagocíticas, como macrófago, monócito, neutrófilo, célula dendrítica o resultado é considerado positivo e conclusivo ⁽¹¹²⁾. O diagnóstico parasitológico é tido como o padrão ouro e apresenta especificidade de até 100%, porém a sensibilidade é variável por conta da imprevisibilidade da distribuição do parasito nas amostras, podendo resultar em resultados falsos negativos ^(112,119). Além disso, a coleta de amostras costuma ser bastante invasiva e pode não ser sensível no caso de cães assintomáticos,

o que sugere que seja um método pouco efetivo para o sistema de saúde público do Brasil ^(30,118).

1.8.1.2 Histopatológico e Imuno-histoquímica

O método histopatológico é também parasitológico e pode ser feito com o tecido dos órgãos citados acima e com a coloração com hematoxilina e eosina. A identificação de amastigotas torna o teste conclusivo. Esse método apresenta a sensibilidade de aproximadamente 32,35%. A Imuno-histoquímica geralmente é utilizada como método confirmatório, que aumenta a sensibilidade a 62%, e é principalmente utilizada em tecidos com baixa carga parasitária ⁽¹²⁰⁾.

1.8.1.3 Cultura *In vitro*

A cultura é um método que aumenta a sensibilidade, principalmente quando feitas várias inoculações de tecidos, como linfonodos e baço, em diferentes tubos, sendo os mesmos observados rotineiramente para visualização de promastigotas, derivadas de amastigotas, após o rompimento das células. Ela pode ser ainda usada para aumentar a sensibilidade dos métodos parasitológicos. No entanto, os resultados podem demorar até quatro semanas, pois as cepas podem crescer em tempos diferentes e, ainda, a carga parasitária de cada cão pode variar, de modo que há uma imprevisibilidade na duração do método tornando-o demorado e oneroso em termos financeiros ⁽¹¹²⁾. A utilização da imuno-histoquímica como segundo método do protocolo pode aumentar ainda mais a sensibilidade ⁽¹²¹⁾.

1.8.2 Métodos indiretos

1.8.2.1 Molecular

Os métodos moleculares são utilizados como alternativa para mitigar as limitações já bem conhecidas dos métodos parasitológicos e sorológicos. Novas abordagens baseadas na reação em Cadeia da Polimerase foram desenvolvidas como alternativas para melhorar o diagnóstico de LVC ⁽¹²¹⁾. Os principais métodos utilizados ultimamente são: Reação em cadeia da polimerase (PCR), Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) e Ensaio Baseado em Sequência de Ácido Nucléico (NASBA).

O PCR se mostrou eficiente para a identificação do DNA da *Leishmania*, apresentando alta sensibilidade e especificidade ^(122,123), e provando ser um dos métodos mais informativos de diagnóstico de leishmaniose, por isso vem sendo um dos métodos moleculares mais utilizados ^(124,125). Essa metodologia pode ser utilizada em diversas amostras de tecidos diferente, como fígado, baço, linfonodos, medula óssea e até mesmo coletando células epiteliais da conjuntiva com hastes flexíveis, método inovador e não invasivo ^(123,126,127).

Além disso, utilizando essa técnica é possível fazer a identificação da espécie presente na amostra ⁽¹²⁸⁾. Os protocolos comumente utilizados apresentam sensibilidade que varia entre 72,2% e 98,7% e especificidade entre 83,2% e 96,4% para cães ⁽¹²⁹⁾. A técnica de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) é um teste que pode ser feito após a PCR. É um método alternativo, rápido e que requer menos tempo e material que o seqüenciamento dos produtos de PCR ⁽¹³⁰⁾. É baseado na digestão do produto do PCR de genes específicos com enzimas de restrição que produzem fragmentos diferenciados para cada espécie. Dessa forma, sabendo o padrão de restrição para cada espécie, é possível comparar os

fragmentos e identificar a espécie de *Leishmania* encontrada na amostra infectada ⁽¹³¹⁾. As desvantagens dessa técnica estão no fato deste método ser caro, não diferenciar entre cães sintomáticos e assintomáticos e requer estrutura laboratorial para sua execução ⁽⁴⁴⁾.

O método LAMP foi descrito no ano de 2000 por Notomi e colaboradores ⁽¹³²⁾. Esse método consiste na amplificação de moléculas de DNA à temperatura constante, entre 60 e 65 °C. Para isso, utiliza-se a DNA polimerase de *Bacillus stearothermophilus* e quatro primers específicos, que são capazes de amplificar estruturas em forma de loop. É considerada uma técnica rápida, capaz de amplificar poucas cópias de DNA (até 10⁹) em apenas uma hora e pode identificar *Leishmania* em tecidos de órgãos e sangue de pacientes infectados ^(132–136). As características limitantes desta técnica esta no fato de não diferenciar entre sintomáticos e assintomáticos e ser uma técnica cara ⁽⁴⁴⁾.

O NASBA é um método que depende de primers e pode ser usado para uma amplificação contínua e rápida de ácidos nucléicos, utilizando uma composição única de materiais e em uma temperatura constante. Esse método utiliza RNase, T7 RNA polimerase, transcriptase reversa de AMV (avian myeloblastosis virus) e dois primers específicos. Essa técnica é capaz de multiplicar em 10⁶ a quantidade de cópias de DNA e em 10⁹ as cópias de RNA em um período entre duas e quatro horas ⁽¹³⁷⁾. Esta técnica também não pode ser amplamente utilizada atualmente, por ser cara e necessitar de estrutura laboratorial para sua execução ⁽¹³⁷⁾.

1.8.2.2 Sorológico

Nos métodos sorológicos o objetivo é detectar anticorpos ou mesmo os antígenos específicos da espécie de *Leishmania* de interesse. Os métodos atualmente utilizados são: ELISA (Enzyme-linked Immunoorbent

Assay) ou Ensaio imunoenzimático (EIE) e Imunocromatografia ⁽¹¹⁹⁾.

O protocolo sorodiagnóstico utilizado atualmente no Brasil é feito com a aplicação do teste rápido imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform) seguido pelo teste laboratorial ELISA (EIE) como teste confirmatório dentro de duas semanas. Esse protocolo apresenta a acurácia de 97% em animais infectados assintomáticos e de 91% em animais infectados sintomáticos ⁽¹³⁸⁾. Porém esses métodos apresentam suas limitações, com altos níveis de falsos positivos relacionados a outras doenças, como a hanseníase, tuberculose, malária, tripanossomíase, esquistossomose e outras leishmanioses ^(139,140). Uma preocupação extra refere-se à implementação da vacinação contra LV no Brasil, pois os testes sorológicos atualmente utilizados no Brasil podem resultar em falso positivo nos cães vacinados ⁽⁵²⁾.

O DPP, utilizado hoje no Brasil, é um método imunocromatográfico que consiste em uma plataforma com um filtro impregnado com o antígeno recombinante rK28, uma quimera entre os antígenos K9, K26 e K39 de *L. infantum* ⁽¹⁴¹⁾. A avaliação mais recente identificou que o teste DPP apresenta 75% de sensibilidade e 73% de especificidade para cães assintomáticos e 94% de sensibilidade e 56% de especificidade para cães sintomáticos ⁽¹⁴²⁾. A vantagem nesse teste é que por ser rápido, exigir pouca experiência do avaliador e por ser mais barato, pode ser aplicado em campo e se encaixa melhor na realidade da saúde pública no Brasil.

Quando o teste DPP tem resultado positivo ou indeterminado, é feito o método ELISA, o qual funciona como teste confirmatório. ELISA é um método imunoenzimático que apresenta sensibilidade e especificidade variáveis, a depender do antígeno analisado e do estado clínico do cão. A vantagem desse método é que ele pode ser adaptado para avaliar diferentes antígenos concomitantemente, como proteínas recombinantes, antígenos citoplasmáticos, peptídeos sintéticos e antígenos purificados ^(112,115,143).

1.9 Proteínas recombinantes

Proteínas recombinantes têm sido utilizadas em testes rápidos de imunocromatografia, alguns exemplos são as proteínas recombinantes K39 (121,144,145), K28 (141) e KLO8 (114,146). Algumas moléculas de *Leishmania* têm sido testadas como potenciais testes sorológicos, algumas já foram testadas com pacientes que tinham o diagnóstico de LV e LC. Por exemplo, pacientes infectados apresentam alta titulação de anticorpos para a proteína antioxidante TSA, proteína de membrana cinetoplastida KMP11 e proteína A2 de amastigotas. Mas, os valores de sensibilidade e especificidade de cada proteína utilizada em métodos diagnósticos são variáveis e muitas vezes falham em termo de acurácia. Em um estudo recente, identificou-se que há uma alta porcentagem de cães com diagnóstico soronegativo com resultado positivo em análise por PCR ⁽⁷⁶⁾. Sendo assim, a inovação no que diz respeito a testes diagnósticos e a produção de antígenos protéicos recombinantes apresenta-se como uma possibilidade de melhoria em especificidade e sensibilidade para detecção da leishmaniose. Duas proteínas de *Leishmania infantum* foram identificadas como altamente imunogênicas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), podendo ser então potenciais alvos para diagnóstico sorológico de LVC, são elas a ADF/Cofilina e a Rab1-GTPase.

1.9.1 ADF/Cofilina

A proteína ADF/Cofilina é uma proteína presente em todos os eucariotos, relacionada à regulação de montagem e desmontagem dos filamentos de actina, extremamente importantes para os processos de endocitose, tráfego intracelular, divisão celular e mobilidade ⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾. Sua

função principal é a despolimerização de filamentos de actina começando de suas extremidades, permitindo dessa forma, a dinâmica do filamento⁽¹⁵⁰⁾. Essa proteína foi encontrada em *Toxoplasma*, *Achantamoeba*, *Leishmania*, entre outros⁽¹⁵¹⁾. A isoforma dessa proteína é importante para a montagem e mobilidade do flagelo da *Leishmania* e é essencial na sua divisão celular^(151,152).

1.9.2 RAB 1 – GTPase

O tráfego intracelular de vesículas e substâncias é um processo complexo e que deve ser corretamente regulado. As principais reguladoras do tráfego intracelular são as proteínas RAB-GTPases, que são capazes de interagir com proteínas efetoras, selecionam as cargas, promovem a formação e indicam o local correto de fusão das vesículas⁽¹⁵³⁾.

1.10 Controle e tratamento

O controle da LVC no Brasil é norteado por três componentes principais. O primeiro é o uso de inseticidas nas casas, nos panos dos animais e nas coleiras, com o intuito de diminuir a densidade da população local do vetor e, possivelmente, evitar o contato do vetor com os humanos nas áreas peri domiciliares. O segundo é o diagnóstico com a utilização de duas metodologias: o teste rápido (TR-DPP) e a ELISA, em conjunto com o tratamento. O terceiro é a eutanásia de cães soropositivos, o que promove conflitos éticos^(48,57,154), mas tem como objetivo diminuir a transmissão do parasito para o vetor e conseqüente infecção de outros cães e humanos^(155,156).

Entretanto, há atualmente um projeto de lei 884/19, que está em

tramitação e já foi aprovado pelas comissões de Seguridade Social e Agricultura, propondo o controle da eutanásia de cães infectados, que procura garantir o direito do proprietário de tratar seu cão infectado, desde que arque com os custos do tratamento e garanta que o cão será acompanhado pelos órgãos de controle de zoonoses ⁽¹⁵⁷⁾.

Há ainda medidas preventivas como a vacinação de cães não infectados. Um estudo realizado com cães saudáveis imunizados com duas vacinas (LEISHVACIN e LEISHMUNE®) desenvolvidas com outras espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis* e *L. donovani*) demonstrou a ativação eficiente de monócitos para ambas as vacinas, e ativação seletiva de linfócitos T e B a depender da vacina administrada. E ambas as abordagens identificaram o desenvolvimento de uma resposta imune mais próxima do ideal, diferente do que se observa em cães naturalmente infectados e sintomáticos. Porém, é possível que o desenvolvimento da resposta imune de cães infectados assintomáticos e imunizados seja similar, o que compromete a eficácia de alguns métodos diagnósticos e de abordagens de controle e prevenção da leishmaniose visceral ⁽¹⁵⁸⁾. Apesar de todas as medidas citadas acima, o resultado esperado pelo Ministério da Saúde não está sendo atingido e os casos de VL em humanos mais que dobrou entre os anos de 1990 e 2016 ^(29,155).

Zuben e Donalísio ⁽¹⁵⁹⁾ discorrem a respeito das possíveis explicações para tal resultado no Brasil e iniciam relatando o reduzido quantitativo de profissionais qualificados para a identificação, diagnóstico e remoção de cães infectados. Existe uma variedade de sinais clínicos semelhantes a outras doenças e as variações histopatológicas inespecíficas ⁽³⁰⁾. Há ainda a falha dos atuais métodos diagnósticos, a falta de um teste diagnóstico 100% específico e sensível, ainda mais quando empregados para a identificação do que se estima ser uma grande quantidade de cães assintomáticos. Ainda quando identificados, pode haver a recusa pela parte do dono em seguir os protocolos preconizados pelo Ministério da Saúde, com a utilização de tratamentos que ainda

mostram baixa eficácia ⁽³⁰⁾. Por último, a substituição de cães infectados por novos cães não infectados em áreas endêmicas, por conta de migrações, compra ou adoção de cães domésticos ⁽¹⁵⁹⁾.

O tratamento da LVC é feito por quimioterapia. Os principais fármacos utilizados atualmente no Brasil são a miltefosina, antimoniais pentavalentes e anfotericina B. Há ainda outras opções alternativas, são elas: isodionato de pentamida, fluconazol, cetoconazol, antimoniato de meglumina, itraconazol, miconazol e alopurinol ⁽³⁰⁾. No entanto, esses tratamentos apresentam alta toxicidade celular, por conta principalmente dos compostos antimoniais, e induz a remissão temporária dos sinais clínicos ⁽³⁰⁾. Os cães tratados apresentam ainda alta taxa de recidivas, por volta de 74% durante o primeiro ano ⁽¹⁵⁴⁾ e o efeito contra a infecção de flebotomíneos é limitada ⁽³⁰⁾.

O estudo de Yasur-Ladau e colaboradores indica ainda que parasitos isolados de cães tratados adquirem resistência, são até cinco vezes mais resistente aos medicamentos que os parasitos coletados de cães não infectados ⁽¹⁶⁰⁾. Esses são dados alarmantes, que nos remetem à importância do controle de LVC e monitoramento dos cães infectados, ainda que estejam sendo tratados, para que haja diminuição na incidência e prevalência da doença entre cães e entre humanos ⁽¹⁵⁴⁾.

2. JUSTIFICATIVA

Leishmania infantum é a espécie etiológicamente responsável pela leishmaniose visceral, forma mais grave da doença, que infecta milhares de pessoas e cães ao redor do mundo todos os anos. Estudos sugerem que há uma relação diretamente proporcional de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) e infecção por *L. infantum* em humanos. Dados epidemiológicos reforçam que a leishmaniose visceral é uma questão importante de saúde pública no Brasil e no Distrito Federal. Então, para

compreensão e combate à essa doença, é preciso investimento no reconhecimento do desenvolvimento da resposta celular após a infecção pelo protozoário.

Os leucócitos são responsáveis pela resposta imune, inata e adaptativa, desenvolvida como proteção à infecção por *L. infantum*. Para cada tipo de antígeno, costuma-se observar diferenças na expressão de moléculas de superfície em leucócitos, decorrente de diversos fatores envolvidos com a identificação, fagocitose, apresentação e ativação de células responsáveis por eliminar o patógeno.

A compreensão da interação entre o parasito e o hospedeiro é de suma importância para a identificação dos mecanismos de infecção da *L. infantum* e a patogênese da doença, destacando-se os fatores relacionados ao direcionamento da resposta imune do hospedeiro que delimitam o desenvolvimento das formas leves ou graves da doença. Há poucos estudos caracterizando detalhadamente a expressão de moléculas de superfície em leucócitos caninos diferenciando sintomáticos de assintomáticos.

Portanto, o estudo de leucócitos expostos a parasitos *L. infantum* é essencial para produzir evidências que possam indicar as diferentes respostas destas células quando expostos a diferentes antígenos oriundos de *L. infantum*, solúvel e recombinantes, e a avaliação da indução da morte das células infectadas pelo parasito. O estudo pode ser ainda de suma importância para o desenvolvimento de novos marcadores de diagnóstico e prognóstico para a leishmaniose visceral canina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

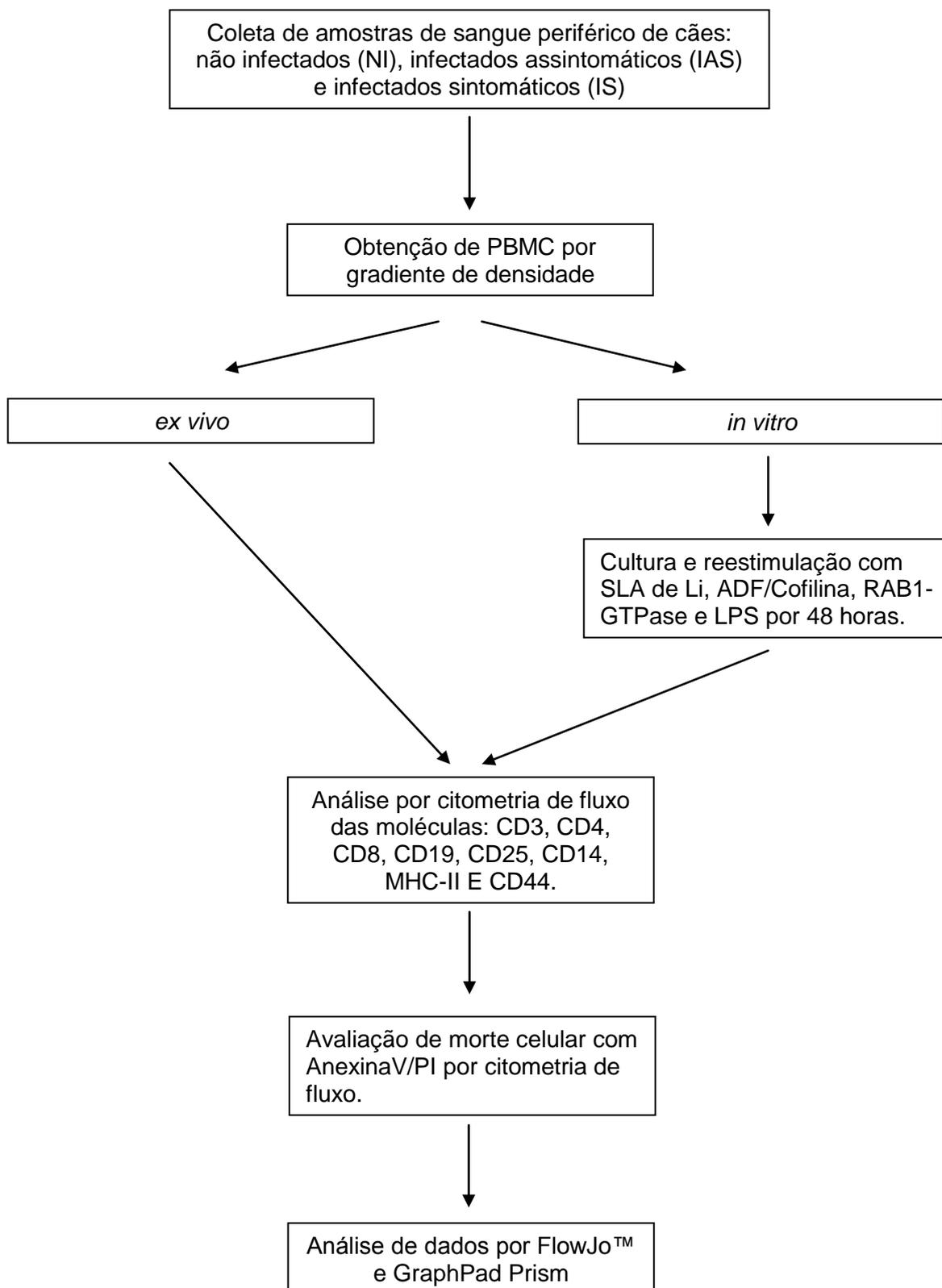
Avaliar a expressão de marcadores celulares fenotípicos em leucócitos de cães infectados, com diagnóstico sorológico de LVC positivo, sintomáticos e assintomáticos.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar, em *ex vivo*, a expressão de marcadores fenotípicos da superfície de leucócitos dos cães infectados, sintomáticos e assintomáticos;
- Caracterizar a expressão dos marcadores, após reestimulação *in vitro*, com antígeno solúvel e recombinante de *L.infantum* em leucócitos dos cães infectados, sintomáticos e assintomáticos;
- Caracterizar o processo de morte celular de células mononucleares provenientes desses animais, *ex vivo* e *in vitro*

4. MÉTODOS

4.1 Desenho experimental



4.2 Cultura de *Leishmania infantum*

Amostras da espécie *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), foram utilizadas para a produção do Antígeno Solúvel de *Leishmania* (SLA). Os parasitos foram descongelados e ressuspensos em meio Schneider completo, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), 1% de antibiótico Penicilina-Estreptomicina 100X (Gibco®). Em seguida, foram cultivadas em tubo falcon de 15 mL, com o meio NNN (Agar contendo 0,6% de NaCl, 10% de sangue e 5% de glicose). As *Leishmanias* foram incubadas a 25 °C por 72 horas, quando então a cultura foi transferida para uma garrafa de cultura (Kasvi), e nela foi adicionado o meio Schneider suplementado para a expansão dos parasitos e obtenção de quantidade suficiente para preparo do antígeno. As *Leishmanias* foram quantificadas em câmara de Neubauer periodicamente para que o crescimento da cultura fosse monitorado e para a identificação da fase estacionária. As promastigotas foram obtidas de culturas em fase estacionária (5-7 dias), com menos de cinco passagens *in vitro*.

4.3 Obtenção do antígeno solúvel (SLA) de *Leishmania infantum*

O volume total de cultura com as formas promastigotas de *Leishmania* foram coletadas no volume total da cultura e centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 750xg, por duas vezes, em solução salina PBS (tampão salina fosfato) 1 X estéril (0,8% de NaCl, 0,14% Na₂HPO₄, 0,02%KCl e 0,20%g KH₂HPO₄). O sedimento obtido de *Leishmania* foi armazenado em freezer a -20° C até a finalização do preparo do antígeno.

Após a obtenção do estoque satisfatório, as formas promastigotas foram descongeladas a 4° C, centrifugadas a 750xg em centrífuga refrigerada por 15 minutos e o sedimento foi ressuspensionado com água

destilada esterilizada num volume igual à metade do volume desse sedimento. As células foram rompidas por congelamento súbito, em freezer -80°C por 15 minutos alternando com o banho-maria a 37° C. O processo foi repetido seis vezes. Mantendo os antígenos no gelo foi aplicada a ação de ultrassom 5.0 MHz efetuando seis séries de 30 segundos com intervalos de 1 minuto. O produto resultante foi centrifugado por 60 minutos em ultra centrífuga, a 4° C e 14.000 g. Recuperado o sobrenadante, ele foi filtrado em sistema esterilizante (membrana 0,22µ) e após a dosagem de proteínas, estas foram alíquotadas em volumes de 500µL e armazenadas à temperatura de - 20° C (161).

4.4 Dosagem de SLA de *L.infantum*–Qubit™

A quantificação de SLA foi feita com o kit Qubit™ (Invitrogen). Para isso preparou-se o reagente fluorescente a partir da solução contendo fluoróforo e tampão do kit, na proporção de 1:200. Em seguida, alíquotas de 5 ul de amostra de SLA diluídas em água miliQ (1:3) foram adicionadas ao reagente, atingindo o volume final de 200µl. A solução foi incubada por 15 minutos e analisada no equipamento portátil Qubit 2.0™. Após a leitura de cada amostra de SLA, a concentração final foi obtida pela multiplicação do valor da leitura pelo fator de diluição escolhido.

4.5 Obtenção de antígenos recombinantes de *L.infantum*

As proteínas recombinantes Rab-1 GTPase e ADF/Cofilina foram obtidas pela mestre Gisele Lorrana Silva Santos do laboratório do Professor Doutor Vicente de Paulo Martins, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (162). Essas proteínas foram gentilmente cedidas para a realização da

análise *in vitro* do presente estudo.

4.6 Grupos de estudo

Os grupos de estudo foram selecionados de acordo com os seguintes critérios:

- A) Sintomáticos: cães com histórico epidemiológico compatível, com sinais clínicos aparentes e com testes diagnósticos sorológicos DPP e ELISA positivos. Ambos os testes realizados pelo CCZ de Brasília/DF.
- B) Assintomáticos: cães com histórico epidemiológico compatível, sem sinais clínicos e com testes diagnósticos sorológicos DPP e ELISA positivos. Ambos os testes realizados pelo CCZ de Brasília/DF.
- C) Não infectado: cães com ou sem histórico epidemiológico compatível, sem sinais clínicos e com teste diagnóstico sorológico DPP negativo. O teste foi realizado pelo CCZ de Brasília/DF.

4.7 Obtenção de PBMCs

As amostras de sangue de cães com o diagnóstico positivo e negativo (por sorologia) foram obtidas no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Brasília/DF, em projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnBDoC nº106668/2014), juntamente com as fichas de dados epidemiológicos dos animais, já preenchidas. O sangue periférico foi coletado anteriormente ao processo de eutanásia dos animais, em tubos de coleta a vácuo com heparina sódica de 10mL (eBioscience), que foram acondicionados à temperatura ambiente e enviados ao laboratório para a obtenção de leucócitos. Foram utilizadas amostras de 11 cães sintomáticos ou assintomáticos e de 4 cães não infectados, grupo controle. O tamanho da amostra foi escolhido baseado em dados da literatura, nos trabalhos de Chiku (105), Araújo (158) e de Trajano-Silva (163).

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) das amostras de sangue dos cães foram obtidas por gradiente de densidade em Ficoll (GE Healthcare) segundo protocolo de Trajano-Silva (163). O sangue foi diluído em PBS 1X estéril na proporção de 1:2 e lentamente vertido sobre o Ficoll na proporção de 1:2, com o cuidado de não misturar as fases. Os tubos foram centrifugados a 900g por 30 minutos a 25°C, sem desaceleração. A nuvem de leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos) foi coletada após a centrifugação, por aspiração com pipeta graduada, e as células foram lavadas duas vezes em PBS 1X (pH= 7,2) a 4°C. O pellet foi ressuspensionado em RPMI para contagem. A quantificação foi feita por contagem em câmara de Neubauer e utilizamos a exclusão de células inviáveis por azul de Tripán. Parte das células foi utilizada para as análises *ex vivo* enquanto o restante seguiu para a cultura de células, para o experimento *in vitro*. As células do experimento *ex vivo* seguiram direto para a marcação, aquisição e análise em citometria de fluxo, sem estimulação.

4.8 Citocentrifugação

Para avaliar a pureza de separação de células mononucleares (PBMCs), fizemos o protocolo de citocentrifugação. Para cada lâmina calculamos o volume que correspondia à concentração de 5×10^5 células e centrifugamos em centrífuga de eppendorfs com a rotação de 600g a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, adicionamos 200 uL de PBS 1X e foi colocado na citocentrífuga para fixação das células nas lâminas. Para coloração das lâminas foi feito o kit Instant-Prov (NEWPROV), conjunto de corantes para coloração diferencial rápida em hematologia. A avaliação foi feita por microscopia óptica e foi realizada com o microscópio da marca Nikon.

4.9 Cultura de células e estimulação - *In vitro*

As células foram ajustadas para 5×10^6 /mL por poço e cultivadas em RPMI 1640 suplementado com SBF 10%, antibiótico 1% (penicilina-estreptomicina) e foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (10 ug/mL), com as proteínas recombinantes Rab-1 GTPase e ADF/Cofilina (1 ug/mL) e LPS (100 ng/mL). As células foram cultivadas em placas de 24 poços (Greiner Bio-One) em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO² por 48 horas.

4.10 Marcação para análise por citometria de fluxo

As células mononucleares foram analisadas *ex vivo* e *in vitro* por citometria de fluxo. Para tanto, as células foram coletadas em tubos *ependorf* de 1,5 mL, lavadas uma vez com PBS 1X e centrifugadas por 10 minutos a 500xg e a 4°C. Em seguida, foram ressuspensas em 10µL de tampão FACS 1X (1% BSA, 0,01% azida sódica e PBS 1X), com cada tubo de *ependorf* contendo aproximadamente 10^5 células, e foram incubadas para bloqueio por dez minutos no gelo para evitar ligações em sítios inespecíficos. Após o bloqueio, foi adicionado 200uL de tampão FACS 1X às células e elas foram então lavadas e centrifugadas a 500xg a 4°C por 5 minutos. Parte dessas células foi separada para a detecção de morte celular. Posteriormente, foram adicionados 20uL dos anticorpos, na diluição de 1:20 e em tampão FACS 1X e as células foram incubadas a 4°C, por 30 minutos ao abrigo da luz. Os anticorpos utilizados no estudo foram: anti-CD3 (conjugado à FITC), anti-CD4 (conjugado à APC), anti-CD8 (conjugado à PE), anti-CD14 (conjugado à PE), anti-CD19 (conjugado à FITC), anti-MHCII (conjugado à PerCP-Cy5.5), anti-CD44 (conjugado à FITC), anti-CD25 (conjugado à PE), todos anticorpos reagentes à células caninas (Tabela 1). As diluições de cada anticorpo

foram realizadas segundo as recomendações do fabricante e os “MIX”, combinação de anticorpos, foram preparados de acordo com a Tabela 2. Após a incubação, foi feita uma lavagem para retirada dos anticorpos livres, não ligados, para isso foram adicionado às células 200uL de tampão FACS 1X e estas foram centrifugadas a 500xg a 4°C por dez minutos. O volume após a centrifugação foi descartado e as células foram ressuspendidos em 300uL de tampão FACS 1X e lavadas para a aquisição no citômetro de fluxo.

Tabela 1: **Anticorpos monoclonais utilizados no estudo.**

Anticorpos	Clone	Espécie alvo	Fenótipo celular	Fabricante
CD3/CD8	CA17.2A12/YCATE55.9	Cães	Linfócitos T	BIO-RAD
CD4	YKIX302.9	Cães	Linfócitos T	BIO-RAD
CD25	P4A10	Cães	Linfócitos T	BIO-RAD
MHC-II	L243	Cães, humanos e primatas não humanos	Monócitos	ABCAM
CD14	Tuk4	Cães, humanos, ovelhas, porcos, coelhos, gatos	Monócitos	ABCAM
CD19	MB19-1	Cães e camundongos	Linfócitos B	ABCAM
Anti-CD44	MEM-263	Cães, humanos e porcos	Leucócitos	ABCAM

Tabela 2: **Composição dos “MIX”**. Combinações de anticorpos utilizados nos experimentos, apresentando as moléculas, sua diluição e a fluorescência conjugada ao anticorpo de cada molécula. A Anexina V foi usada em algumas amostras conjugadas à FITC e em outras à com APC.

MIX	FITC	PE	APC	PerCP – Cy5.5
1	CD44	CD14	-	MHC-II
	1:20	1:20		1:20
2	CD3	CD8	CD4	-
	1:20	1:20	1:20	
3	CD19	CD25	CD4	-
	1:20	1:20	1:20	
4	Anexina V*	Iodeto de Propídeo	Anexina V*	-
	1:20		1:20	

* As 13 primeiras amostras foram marcadas com AnexinaV - FITC e as duas últimas com Anexina V-APC.

4.11 Detecção de morte celular em leucócitos

Para detecção do processo de apoptose foram utilizadas marcações que permitem a detecção da apoptose inicial e da apoptose tardia. A marcação de Anexina V permite a identificação do processo de apoptose inicial por citometria de fluxo, e quando em conjunto com a marcação por Iodeto de Propídeo (PI), identifica células em apoptose tardia (164). A morte celular foi analisada tanto nos experimentos *ex vivo* quanto nos *in vitro*. Para tanto, as células foram marcadas com o Kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection (eBioscience). O processo se inicia com a preparação do tampão de ligação para a concentração 1X. As células separadas, em tubo *ependorf* de 1,5 mL, foram centrifugadas com 200uL de tampão

FACS a 500xg, a 4°C por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 195uL de tampão de ligação 1X por tubo e para cada 5×10^5 células. Foram adicionados ainda 5uL de Anexina V por tubo e as células foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 500xg a 4°C por 5 minutos. Foram então ressuspensas em 190uL de tampão de ligação e 10uL de Iodeto de Propídeo por tubo. As células foram adquiridas em seguida no citômetro de fluxo.

4.12 Aquisição e análise dos dados da citometria de fluxo

As células foram adquiridas no citômetro do modelo FACS Verse (BD Biosciences), utilizando-se o Software FACS SUITE. Os gráficos gerados por citometria de fluxo foram analisados no Software FlowJo (Flowjo® versão 10), para identificação das porcentagens de expressão dos marcadores, quantidades e proporções de células marcadas bem como da intensidade média de fluorescência (MFI), caracterizando assim, as amostras analisadas. Foram adquiridas em média 30.000 células de cada amostra, de acordo com o doador, grupo de estudo ao qual pertencia e abordagem, *ex vivo* ou *in vitro*, com suas condições.

4.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad-Prism 10.0 (GraphPad Software Inc). Os valores das proporções de células marcadas e de intensidade média de fluorescência, identificados na análise anterior, foram testados com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como todas as amostras apresentam distribuição não normal (não paramétrica), para as comparações, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, pois esse teste compreende a análise de comparações múltiplas. Os três

grupos (infectados sintomáticos, infectados assintomáticos e não infectados) foram comparados e analisados, com a posterior aplicação do pós-teste de Dunnet. Os valores de mediana e desvio padrão foram informados para cada grupo após análise dos dados. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5. RESULTADOS

5.1 Características da amostra

Para realização do estudo, foram coletadas amostras do sangue periférico de cães, sintomáticos e assintomáticos, e não infectados. As fichas de identificação de cada animal, contendo dados epidemiológicos e clínicos dos cães participantes do estudo, foram preenchidas com o auxílio de um veterinário. Ao todo, foram coletadas amostras de 15 cães, no período de Junho a Setembro de 2019, que foram alocados em três grupos, de acordo com a sintomatologia e o resultado da sorologia, realizada pelo Centro de Zoonoses. Assim, quatro cães foram alocados no grupo dos não infectados, seis do grupo dos infectados assintomáticos e cinco do grupo de infectados sintomáticos (Tabela 3).

Tabela 3: Grupos do estudo e frequência.

Grupos	Frequência
Não infectados	4 (26,7%)
Infectados assintomáticos	6 (40%)
Infectados sintomáticos	5 (33,3%)
Total	15 (100%)

Em seguida, foram elencados os sinais clínicos apresentados pelos cães do grupo sintomático e calculadas as frequências de cada sinal clínico dentro desse grupo. A ornicogribose e a alopecia foram identificadas nos cinco cães pertencentes ao grupo, apresentando 100% de frequência. As

lesões dermatológicas, em várias partes do corpo, estiveram presentes em 60% dos cães sintomáticos. Já as lesões oculares e caquexia foram apresentadas por 40% dos cães pertencentes ao grupo (Tabela 4).

Tabela 4: Sinais clínicos em 5 cães infectados sintomáticos do Distrito Federal (DF), naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Sinais clínicos	Frequência
Lesões dermatológicas	3 (60%)
Ornicogribose	5 (100%)
Lesões oculares	2 (40%)
Alopécia	5 (100%)
Caquexia	2 (40%)

Os dados epidemiológicos dos cães infectados, pertencentes ao grupo de cães infectados sintomáticos e assintomáticos, foram categorizados por faixa etária, sexo, porte, raça e pelagem. A faixa etária dos cães participantes do estudo variou apresentando 27,3% pertencentes à faixa etária entre 0 a 2 anos; 18,2% estavam entre 2 e 4 anos; 18,2% apresentavam idades entre 4 e 6 anos; 9,1% entre 6 e 8 anos e a mesma porcentagem para a faixa entre 8 e 10 anos. Do total, 18,2% tinham a idade desconhecida. Quanto ao sexo, 72,7% eram fêmeas e 27,3% eram machos. A maioria dos cães era de porte pequeno, compreendendo 54,5% do total, os de porte médio e grande representando 18,2% cada e 9,1% não tinham informações sobre o porte. A raça da maioria (72,2%) dos cães era indeterminada e apenas duas raças foram identificadas, sendo que 18,2% eram da raça Pastor Alemão e 9,10% Pinscher. Por último, o comprimento da pelagem também foi observado, sendo 81,8% de pelagem curta, 9,1% tinham pelagem média e a mesma porcentagem não tinham informações a respeito da pelagem (Tabela 5).

Tabela 5: Características fenotípicas e faixa etária de 11 cães infectados, sintomáticos e assintomáticos, do Distrito Federal (DF), naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Características		Frequência
Idade	0-2	3 (27,3%)
	2-4	2 (18,2%)
	4-6	2 (18,2%)
	6-8	1 (9,10%)
	8-10	1 (9,10%)
	Não Determinada	2 (18,2%)
Sexo	Fêmea	8 (72,7%)
	Macho	3 (27,3%)
Porte	Pequeno	6 (54,5%)
	Médio	2 (18,2%)
	Grande	2 (18,2%)
	Não informado	1 (9,10%)
Raça	Pastor Alemão	2 (18,2%)
	Pinscher	1 (9,10%)
	Não Determinada	8 (72,7%)
Pelagem	Curta	9 (81,8%)
	Média	1 (9,10%)
	Não informada	1 (9,10%)

A maioria dos cães é oriunda das regiões administrativas mais próximas à DIVAL, uma vez que 18,2% deles moravam na Fercal, 36,3% em Sobradinho e 27,3% eram moradores do Lago Norte. A origem era desconhecida em 18,2% dos casos (Tabela 6).

Tabela 6: Regiões administrativas de origem de 11 cães infectados do Distrito Federal (DF), naturalmente acometidos por leishmaniose visceral.

Regiões Administrativas	Frequência
Fercal	2 (18,2%)
Sobradinho	4 (36,3%)
Lago Norte	3 (27,3%)
Não informada	2 (18,2%)

5.2 Obtenção de PBMCs

Após obtenção de amostras de sangue, as mesmas foram submetidas à separação por gradiente de densidade de Ficoll, os leucócitos foram coletados, fixados em lâminas de microscopia e corados. Quando analisadas em microscopia óptica, foi observada a presença de monócitos, linfócitos e células de núcleo segmentado, que pela morfologia sugerem ser células polimorfonucleares (PNMs), ou neutrófilos (Figura 8).

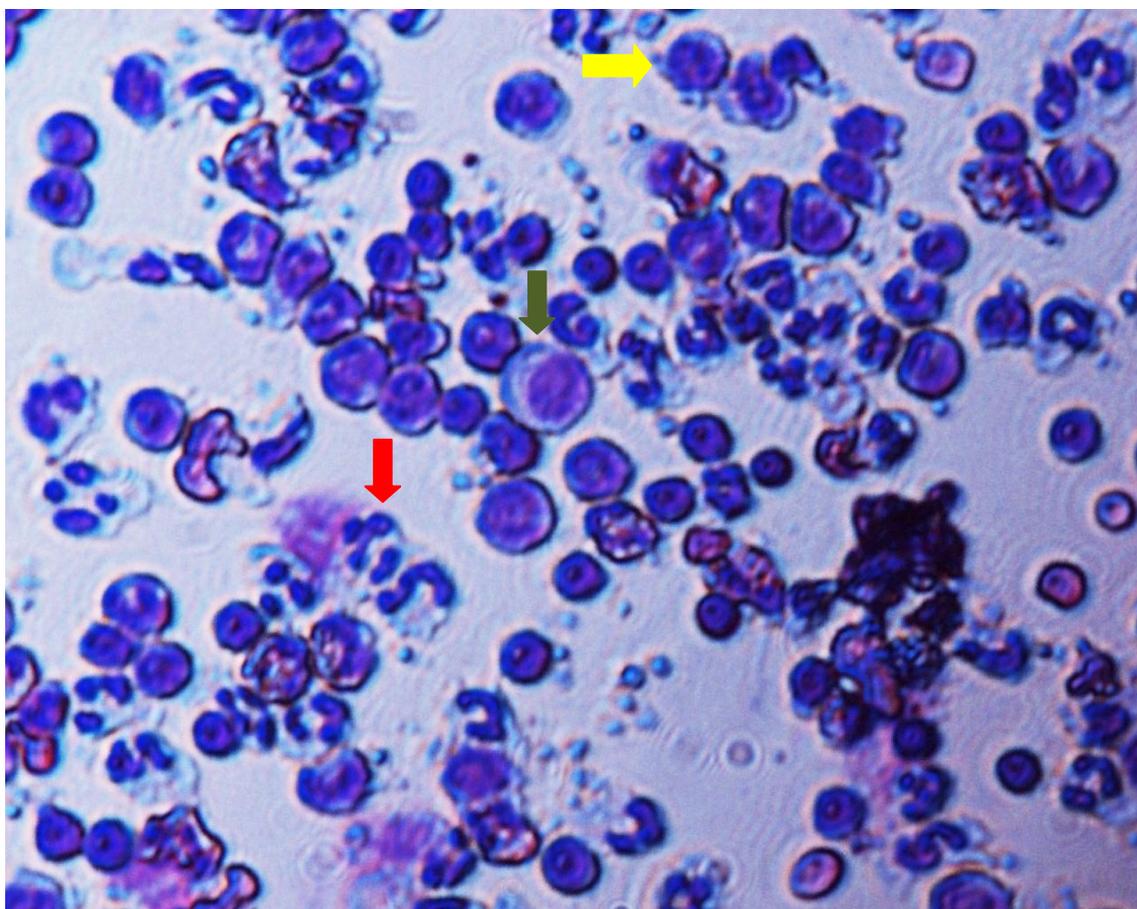


Figura 8. Imagem representativa das células coletas após separação por gradiente de densidade com Ficoll. A lâmina com amostra das células coletadas após a realização do protocolo de separação de PBMCs foi analisada em microscopia óptica (100x), evidenciando alta quantidade de células com núcleo segmentado, PMN (seta vermelha), monócito (seta verde) e linfócito (seta amarela).

5.3 Estratégia de análise - *ex vivo*

Após a obtenção das PBMCs, as mesmas foram marcadas para análise das moléculas de superfície *Ex vivo*, no mesmo dia, e analisadas por citometria de fluxo. As marcações foram feitas para a caracterização fenotípica de linfócitos T, linfócitos B e monócitos caninos. Para isso, foi feita a seguinte estratégia de análise: as populações de linfócitos e monócitos foram selecionadas por um *gate*, de acordo com as informações de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) relatados em literatura. Selecionada a população de interesse, analisou-se a porcentagem de expressão e MFI das moléculas alvo.

Primeiro foram identificadas e selecionadas as células expressando as moléculas CD14. Em seguida, foram selecionadas as células CD14⁺, dentre as células CD14⁺ foram selecionadas as células MHC-II⁺, identificando então a porcentagem da população de monócitos CD14⁺MHC-II⁺. A porcentagem de monócitos correspondeu a 15,9%, os monócitos CD14⁺ corresponderam a 48,2% e os monócitos CD14⁺MHC-II⁺ corresponderam a 99,8% (Figura 9).

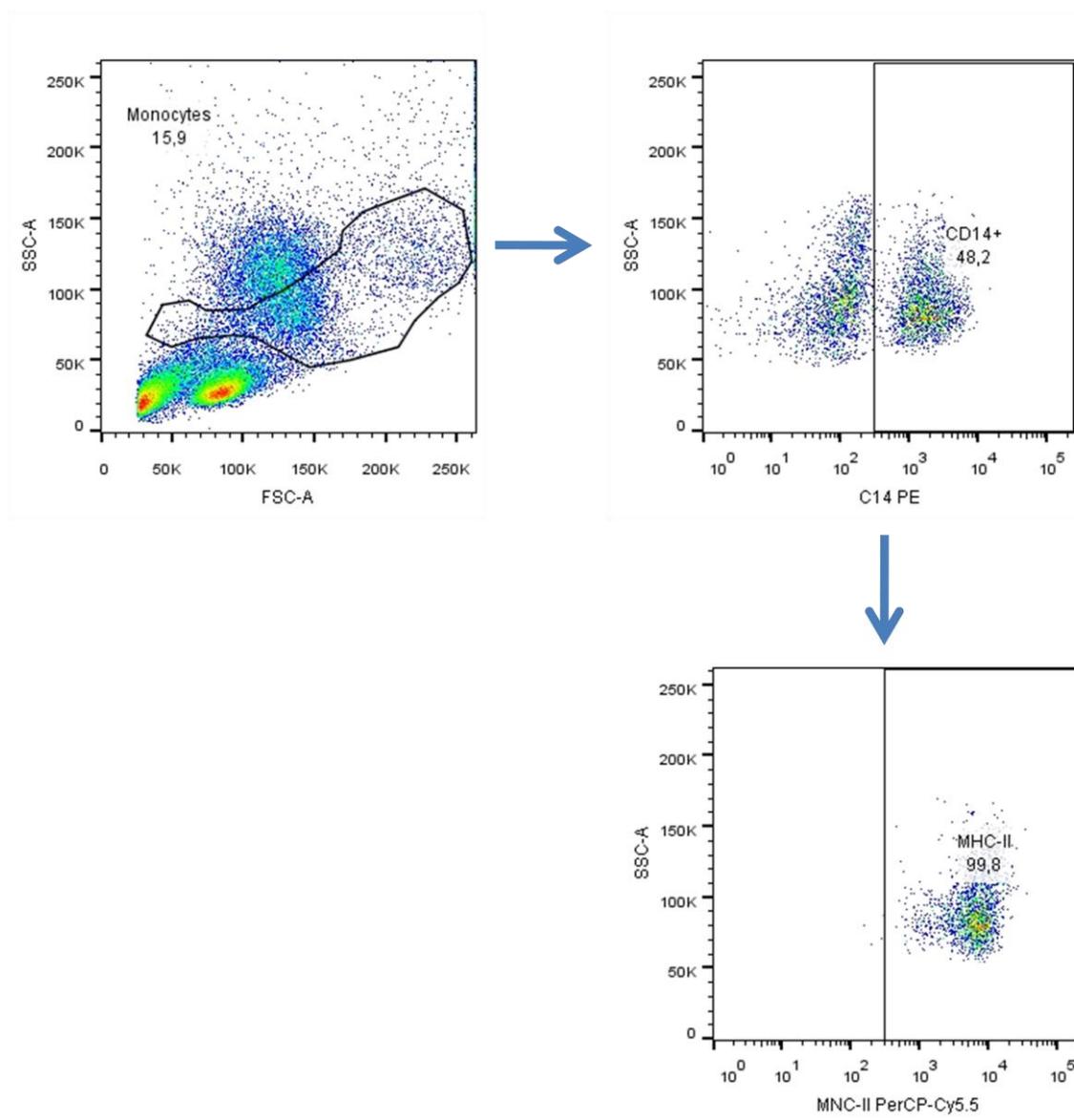


Figura 9. Imagem representativa da estratégia de análise para caracterização fenotípica de monócitos na etapa *Ex vivo*. Representa a estratégia de análise para a caracterização de monócitos, apresentando 15,9% de monócitos, por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), posteriormente, células CD14⁺ (48,2%) e células CD14⁺MHC-II (99,8%). Cada ponto representa uma célula adquirida (pseudocolor).

Inicialmente foram selecionados os linfócitos por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), correspondendo a 35,2 %. Essa população foi analisada quanto à expressão da molécula CD3 e foram selecionadas as células CD3⁺ (87%). Em seguida, foram selecionadas as células CD4⁺ (43,4%). Posteriormente, foram selecionadas dentro do gate de células

CD3⁺, as células CD8⁺ (27,5%). A mesma estratégia foi utilizada para os demais marcadores de linfócitos (Figura 10).

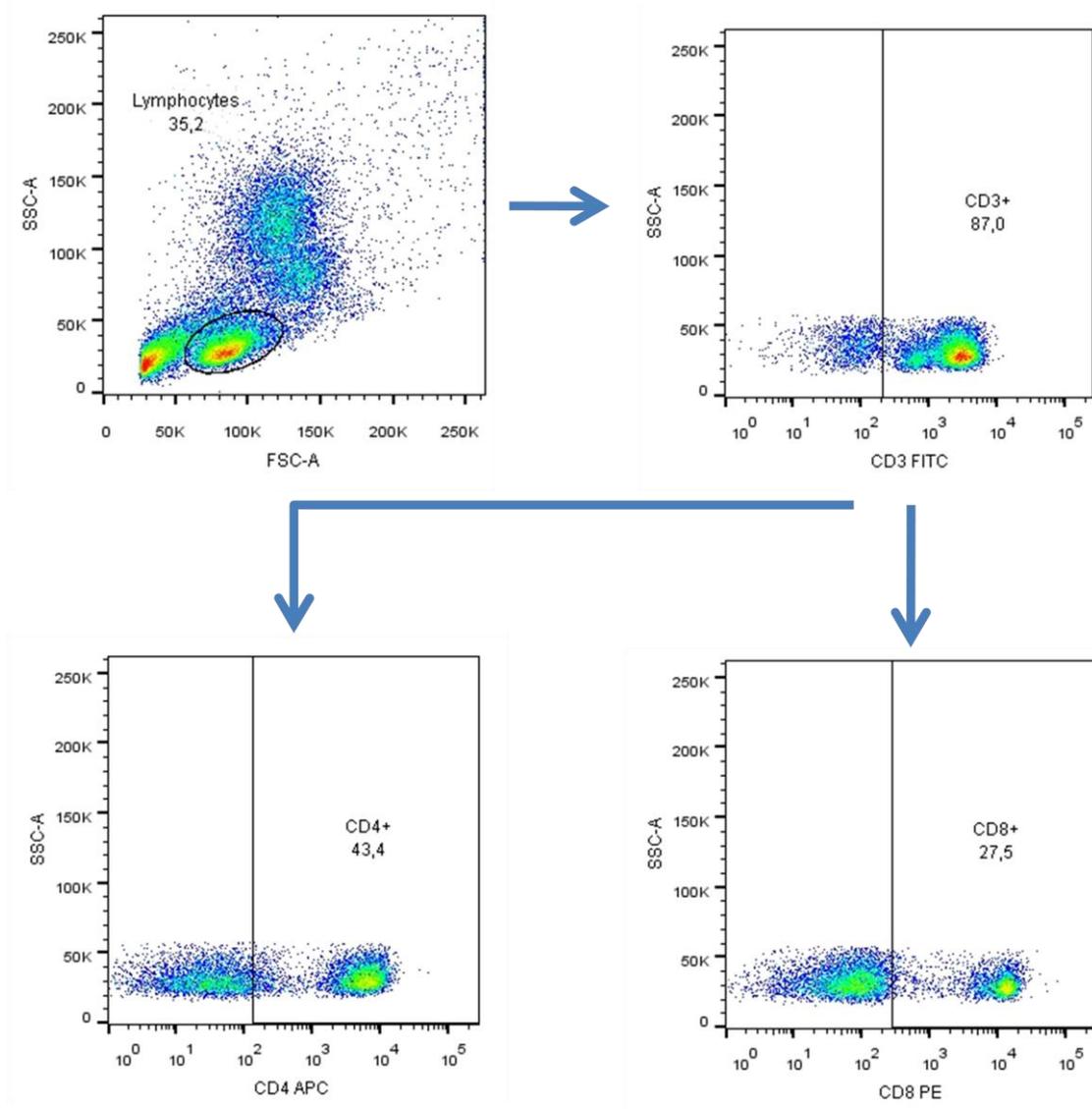


Figura 10. **Imagem representativa da estratégia de análise para caracterização fenotípica de linfócitos na etapa *Ex vivo*.** Representa a estratégia de análise utilizada para a identificação e caracterização de linfócitos por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (35,2%), assim como o grupo de células com marcação das moléculas CD3 dentro desta população (87%), seguida pela a marcação das moléculas CD4 (43,4%) e CD8 (27,5%) expressas dentro do grupo de células CD3+.

5.4 Estratégia de análise – *in vitro*

Após a coleta e separação das PBMCs, as células foram cultivadas em diferentes condições por. Parte delas foi cultivada apenas com o meio de cultura, sendo então o controle negativo. As outras foram reestimuladas com SLA ou com as proteínas recombinantes ADF/Cofilina e RAB1-GTPase. As células foram marcadas para caracterização fenotípica de linfócitos T, linfócitos B e monócitos caninos. A estratégia de análise foi similar à descrita anteriormente, com a marcação das mesmas moléculas para identificação das populações celulares. Nessa etapa a análise foi aplicada às células submetidas a cada condição, iniciando com o MEIO e seguindo com SLA, ADF/Cofilina por último a RAB-GTPase. Para representação da estratégia de análise, a Figura 10 demonstra a estratégia utilizada na identificação de monócitos por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) em cada condição: MEIO (8,63%), SLA (11,3%), ADF/Cofilina (4,95%) e RAB1-GTPase (8%). Ainda, foram identificadas as células CD14⁺ dentro da população de monócitos em cada condição: MEIO (21,6%), SLA (37,4%), ADF/Cofilina (29,5%) e RAB1-GTPase (24,4%) (Figura 11). A mesma estratégia foi utilizada para as demais moléculas marcadoras monócitos e de linfócitos na análise *in vitro*.

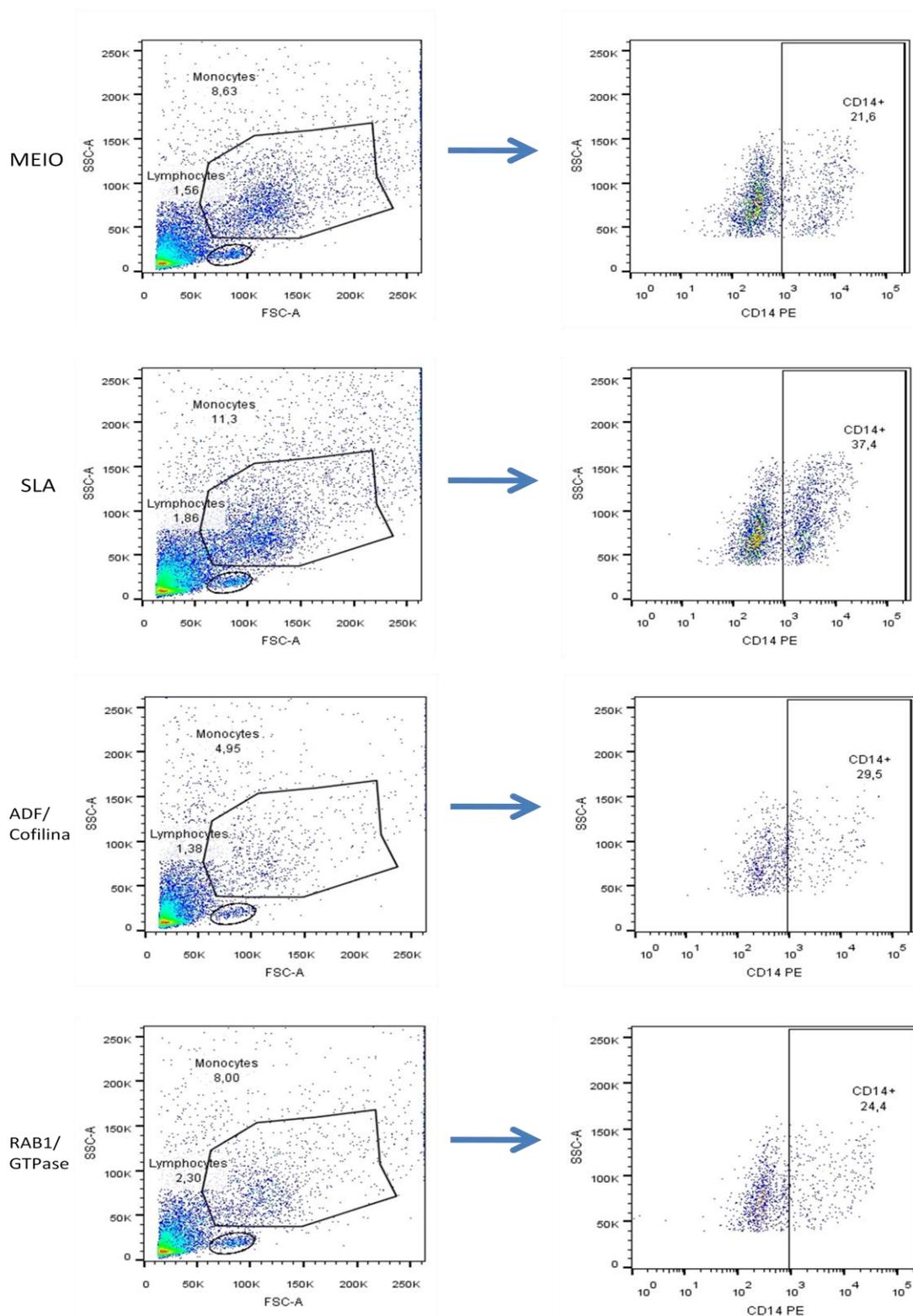


Figura 11. Imagem representativa da estratégia de análise para caracterização de monócitos na etapa *In vitro*. Representação estratégia de análise para reconhecimento e caracterização de monócitos por tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) nas condições:

MEIO (8,63%), SLA (11,3%), ADF/Cofilina (4,95%) e RAB1-GTPase (8%). Ainda, foram marcadas as células CD14⁺ dentro da população de monócitos em cada condição: MEIO (21,6%), SLA (37,4%), ADF/Cofilina (29,5%) e RAB1-GTPase (24,4%).

5.5 Caracterização fenotípica de monócitos - *ex vivo*

Para a caracterização de monócitos caninos, foram marcadas as moléculas CD14, MHC-II e CD44, moléculas altamente expressas em monócitos, e utilizadas em conjunto como marcadores fenotípicos dessa população leucocitária. A molécula CD44, amplamente expressa em leucócitos, foi detectada nos três grupos, sendo que em NI (88,35% \pm 2,582) e IS (90,70% \pm 9,225), a porcentagem de células positivas para essa molécula foi similar. O grupo IAS, por sua vez, apresentou uma tendência à diminuir a expressão CD44 em monócitos (69,00% \pm 13,47) (Figura 12A). A população CD14⁺ estava presente em proporções similares nos três grupos, em NI (34,45% \pm 11,36), IAS (39,00% \pm 7,410) e IS (27,90% \pm 7,048) (Figura 12B). A porcentagem de células CD14⁺ MHC-II⁺ (monócitos) foi maior no grupo NI (88,95% \pm 8,825), não havendo diferença nos grupos IAS (66,15% \pm 3,968) e IS (58,70% \pm 8,491), quando comparado ao grupo controle (NI) (Figura 12C).

Foram ainda analisadas as Médias de Intensidade de Fluorescência (MFI) em cada grupo, para identificação da quantidade de moléculas expressas na superfície das moléculas marcadas. A molécula CD44 foi mais expressa em células dos cães pertencentes ao grupo NI (3209 \pm 367,2), enquanto observamos uma tendência à diminuição do grupo IAS (1790 \pm 267,5) em relação ao NI. Entretanto, o grupo IS (1454 \pm 284,0) demonstrou uma diminuição significativa da expressão de CD44 em relação ao grupo NI (Figura 12D). Quanto à expressão de CD14, essa molécula foi mais expressa no grupo NI (3388 \pm 954,2) e mostrou uma tendência de diminuição da sua expressão nas células de cães dos grupos IAS (1628 \pm 519,8) e IS (3094 \pm 527,8) (Figura 12E). Em relação à expressão de MHC-II em células CD14⁺ foram observadas expressões similares entre os grupos

NI (3347+/-1211) e IAS (3497+/-521,4), enquanto que a expressão do grupo IS foi de 2492+/-364,9 (Figura 12F).

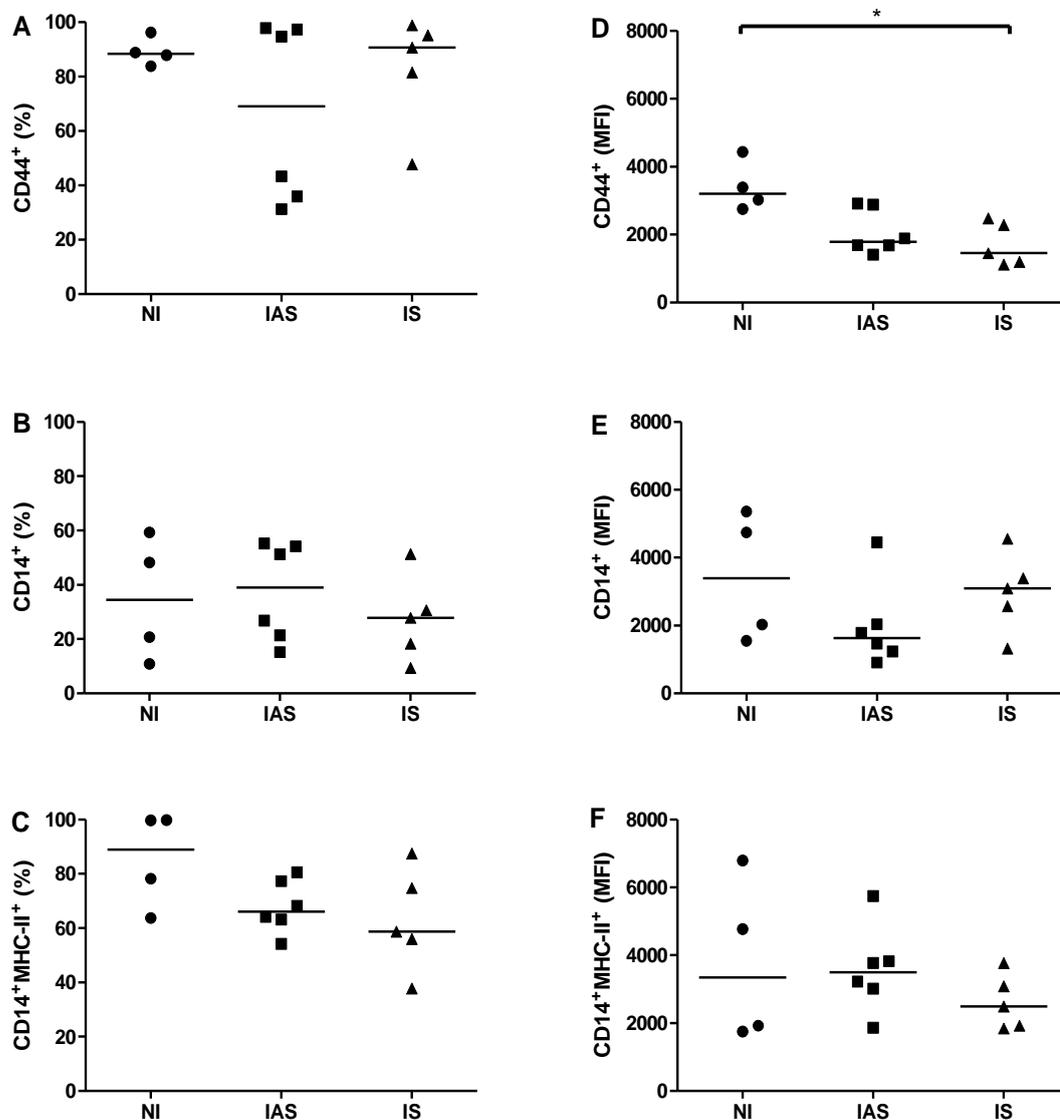


Figura 12. **Caracterização ex vivo e Média de intensidade de fluorescência (MFI) de monócitos de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos.** As figuras representam a quantificação da porcentagem de células expressando CD44 (A), CD14 (B) e a molécula MHC-II em células CD14⁺, nas amostras dos grupos NI, IAS e IS. Ainda apresentam a quantificação da expressão das moléculas CD44 (D), CD14 (E) e da molécula MHC-II expressa em células CD14⁺ (F), nos grupos NI, IAS e IS. Cada ponto representa um indivíduo analisado (mediana+/-erro padrão), *p<0,05.

5.6 Caracterização fenotípica de linfócitos - *ex vivo*

No processo de caracterização de linfócitos caninos, foram marcadas as moléculas CD4, CD25 e CD19 para identificação da população de linfócitos T e de linfócitos B. A molécula CD19⁺ caracteriza a população de linfócitos B, tanto imaturos quanto *naïve*. Sendo assim, a população de linfócitos B circulantes apresentou uma tendência ao aumento no grupo IS (17,60% \pm 6,796), quando em comparação aos grupos NI (10,80% \pm 4,435) e IAS (9,355% \pm 14,69) (Figura 13A). Já as células CD19⁺ e CD25⁺, linfócitos B, houve uma tendência de diminuição nos grupos IAS (24,90% \pm 7,952) e IS (27,30% \pm 11,75), quando em comparação do grupo NI (40,70% \pm 1,612) (Figura 13B). Já a população CD4⁺CD25⁺ variou pouco entre os grupos NI (20,85% \pm 5,341), IAS (13,30% \pm 2,994) e IS (10,10% \pm 6,723) (Figura 13C).

A MFI foi também quantificada para caracterização fenotípica dos linfócitos T e B. Para a molécula CD19, houve tendência de aumento na expressão no grupo IS (3848 \pm 242,6), expressão mediana no grupo IAS (2430 \pm 657,8), quando em comparação com o grupo NI (1214 \pm 254,4) (Figura 13D). Houve detecção da intensidade de fluorescência da molécula CD25 em células CD19⁺, com os valores maiores nos grupos NI (1313 \pm 493,9) e IAS (1092 \pm 673,6), com tendência de diminuição no grupo IS (1158 \pm 89,85) (Figura 13E). A expressão de CD25 no grupo de células CD4⁺ foi também mesurada e foi observado que NI (1775 \pm 125,2), IAS (2136 \pm 174,3) e IS (1477 \pm 1166) apresentaram expressões similares (Figura 13F).

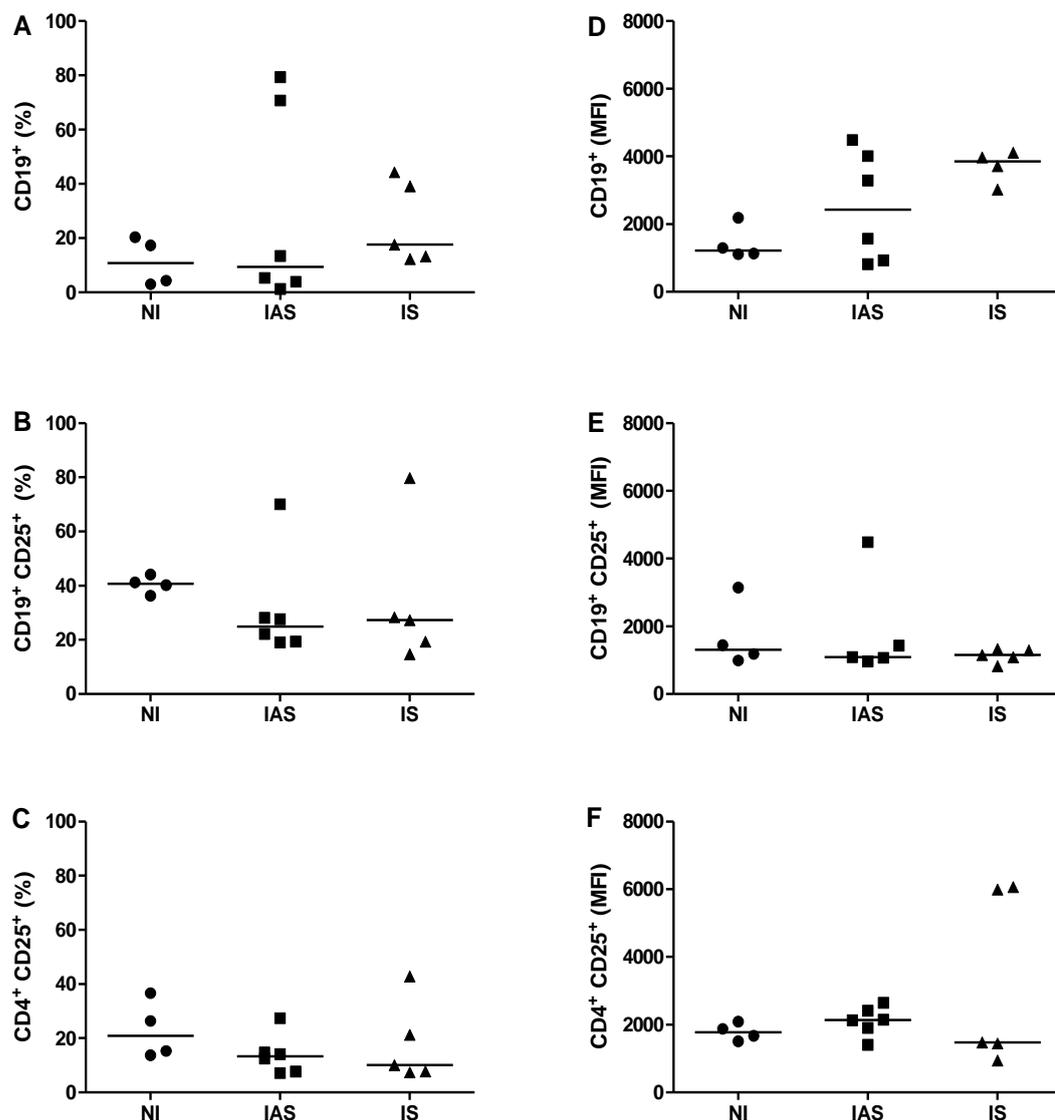


Figura 13. **Caracterização Ex vivo e Média de intensidade de fluorescência (MFI) de linfócitos T e B de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos.** (A) Representa a porcentagem de monócitos expressando moléculas CD19⁺ nos grupos NI, IAS e IS. Já a figura (B) apresenta a porcentagem de linfócitos B CD19⁺CD25⁺ e (C) apresenta a porcentagem de células linfócitos T com marcação CD4⁺ e CD25⁺, em cada grupo (NI, IAS e IS). (D) Ainda, foi feita a quantificação de moléculas CD19 de linfócitos B pertencentes aos grupos NI, IAS e IS. (F) Apresenta a porcentagem de linfócitos B CD19⁺ e CD25⁺, enquanto a figura (E) apresenta a porcentagem de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, nas amostras de cães pertencentes aos grupos NI, IAS e IS. Cada ponto representa um indivíduo analisado (mediana+/-erro padrão).

Além disso, foram marcadas as moléculas CD3, CD4 e CD8, que, quando utilizadas em conjunto, são marcadores fenotípicos de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Na marcação de células CD3⁺ CD4⁺, linfócitos TCD4⁺, foi observada porcentagens semelhantes de células marcadas nos três grupos, NI (39,10%+/- 8,197), IAS (37,75%+/- 5,340) IS (34,40%+/- 3,088) (Figura 14A). Já para identificação de células TCD8⁺, foram feitas as marcações com TCD3 e TCD8, e observou-se uma tendência de diminuição na porcentagem de células positivas nos grupos IAS (25,75%+/-3,370) e IS (28,70%+/- 10,49), quando em comparação com o grupo NI (47,50%+/- 9,221) (Figura 14B).

Para caracterização da quantidade de moléculas expressas na superfície celular de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, foi feito o MFI, quantificando a expressão de cada molécula. Dentro do grupo de células CD3⁺ analisou-se a expressão da molécula CD4, e foi observada tendência de aumento na expressão dessa molécula no grupo IS (8609+/- 1073), apresentando uma diferença significativa em relação ao grupo IAS (5306+/- 882,5), enquanto o grupo NI (5394+/- 34,82) apresentou expressão similar ao grupo IAS (Figura 14C). Já a expressão de moléculas CD8 na população de células CD3⁺ apresentou-se muito similar entre os grupos NI (4320+/-1999), IAS (4020+/- 835,1) e IS (5506+/-455,4) (Figura 14D).

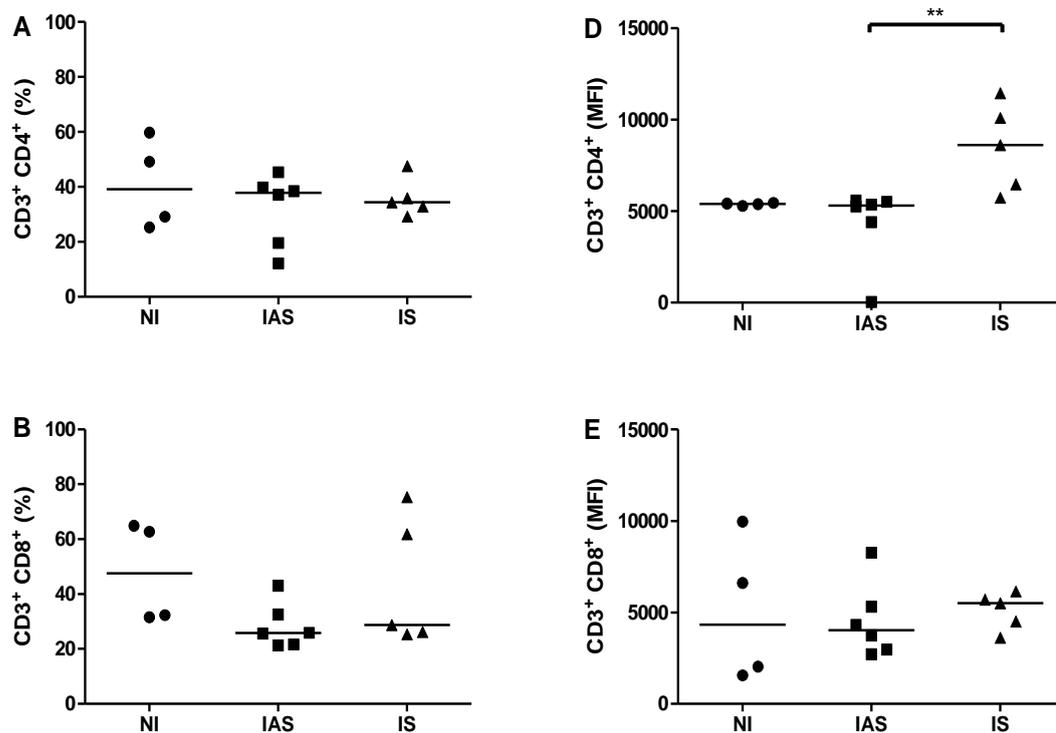


Figura 14. **Caracterização *ex vivo* e Média de intensidade de fluorescência (MFI) de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de cães não infectados, sintomáticos e assintomáticos.** (A) Representa a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺ e (B) a porcentagem de CD3⁺CD8⁺ em amostras de cães pertencentes aos grupos NI, IAS e IS. Ainda, foi feita a quantificação das moléculas CD4 (C) e CD8 (D) expressas em células CD3⁺, pertencentes a amostras de cães de cada um dos grupos NI, IAS e IS. Cada ponto representa um indivíduo analisado (mediana +/- erro padrão), **p<0,001.

5.7 Caracterização de morte celular em análise - *ex vivo*

Sabendo da relevância da regulação da morte celular em doenças causadas por parasitos, analisou-se a morte celular na abordagem *Ex vivo*, por citometria de fluxo da marcação das células com Anexina V e com PI. Inicialmente, foram analisadas as células positivamente marcadas apenas com Anexina V e negativas para PI, observando-se uma diminuição significativa nos valores obtidos para os grupos IAS (3,935%+/-2,198) e IS (2,890%+/-1,530) em relação ao grupo NI (33,30%+/-4,916) (Figura 15A). Na

caracterização de células em necrose (células PI+AnexinaV-), foi possível observar uma baixa porcentagem de marcação em todos os grupos, foi possível observar que os grupos IAS (0,6100% \pm 0,4641) e IS (0,6400% \pm 0,4329) apresentam uma tendência de aumento de morte celular por necrose, quando em comparação ao grupo NI (0,2050% \pm 0,1392) (Figura 15B). As células em apoptose tardias são identificadas pela marcação de AnexinaV⁺ e PI⁺. Assim, observou-se uma tendência de aumento na porcentagem dessas células duplamente marcadas nos grupos IAS (4,295% \pm 15,77) e IS (8,310% \pm 6,834) em comparação ao grupo NI (2,005% \pm 0,3808) (Figura 15C).

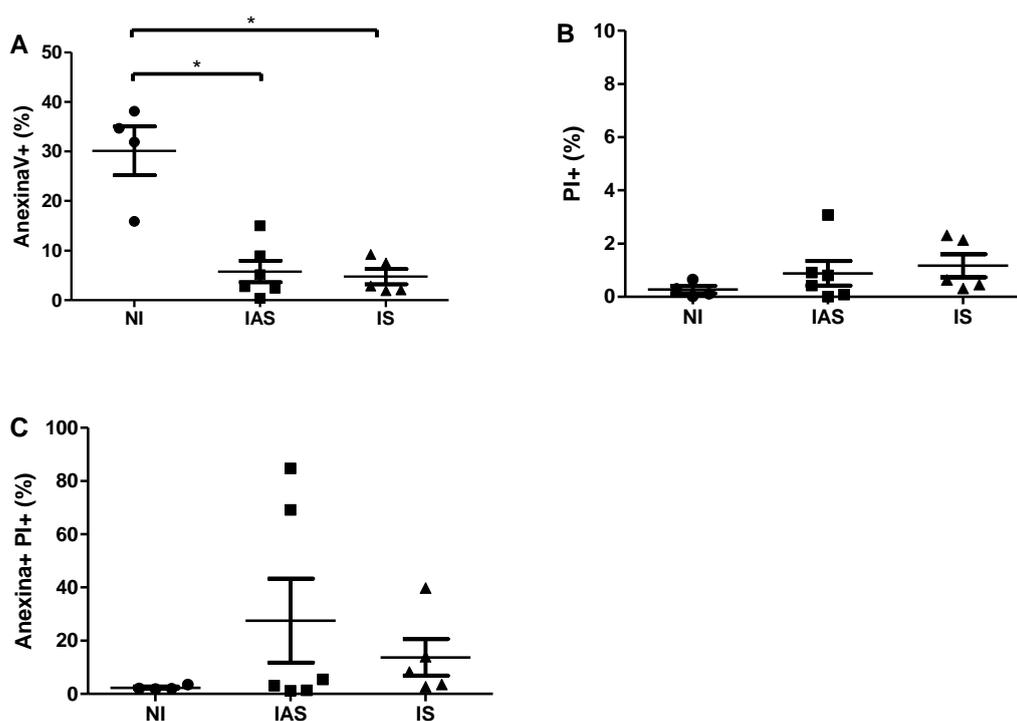


Figura 15. **Caracterização de morte celular de PBMCs em abordagem *ex vivo*.** A figura (A) representa as células em apoptose inicial pertencentes aos grupos NI, IAS e IS. (B) Células em necrose, pertencentes aos três grupos citados acima e (C) células em processo de apoptose tardia nos três grupos participantes do estudo. Cada ponto representa um indivíduo (mediana \pm erro padrão), * $p < 0,05$.

5.8 Resposta de monócitos à reestimulação *in vitro* com antígenos derivados de *L. infantum*

Após separação das PBMCs, as células foram reestimuladas em cultura com SLA e com as proteínas recombinantes ADF/Cofilina e RAB1-GTPase, por 48 horas. Posteriormente foram feitas as análises por citometria de fluxo com as moléculas de caracterização fenotípica de monócitos. A porcentagem de células apresentando marcação para a molécula CD44 no grupo NI manteve-se baixa em todas as condições. Enquanto que os grupos IAS e IS apresentaram tendência de aumento nas expressões de CD44, quando em comparação com o grupo NI. Os valores de média e desvio padrão de cada grupo são os seguintes: MEIO-NI (41,40%±8,400), MEIO-IAS (91,10%±6,235), MEIO-IS (71,10%±9,106), SLA-NI (61,35%±7,250), SLA-IAS (97,30%±2,400), SLA-IS (89,65%±2,778), ADF/Cofilina-NI (28,45%±1,450), ADF/Cofilina-IAS (90,25%±10,83), ADF/Cofilina-IS (65,25%±10,82), RAB1-GTPase-NI (33,35%±3,850), RAB1-GTPase-IAS (91,25%±8,841), RAB1-GTPase-IS (68,80%±9,162), LPS-NI (32,15%±3,550), LPS-IAS (93,00%±10,39) e LPS-IS (74,45%±8,346) (Figura 16A). Observamos uma tendência de aumento de células CD14⁺ após estímulo com SLA para os grupos SLA-NI, SLA-IAS e SLA-IS, em relação aos grupos das demais condições. Os valores referentes à mediana e erro padrão de cada grupo são: MEIO-NI (28,80%±6,400), MEIO-IAS (22,10%±7,529), MEIO-IS (38,25%±8,751), SLA-NI (53,55%±1,450), SLA-IAS (55,80%±8,468), SLA-IS (67,95%±6,545), ADF/Cofilina-NI (17,45%±2,350), ADF/Cofilina-IAS (24,90%±2,763), ADF/Cofilina-IS (28,35%±6,686), RAB1-GTPase-NI (23,45%±4,250), RAB1-GTPase-IAS (21,20%±4,220), RAB1-GTPase-IS (26,10%±9,254), LPS-NI (19,40%±0,500), LPS-IAS (28,00%±5,430) e LPS-IS (33,85%±7,827) (Figura 16B). Observando ainda a porcentagem de células CD14⁺ que expressam MCH-II, foi identificado que a maioria das células são duplo positivas após os tratamentos. Os valores de cada grupo são os seguintes: MEIO-NI (78,05%±10,35), MEIO-IAS (93,15%±0,7977), MEIO-IS

(96,55% \pm 2,936), SLA-NI (95,90% \pm 1,400), SLA-IAS (98,30% \pm 0,6830), SLA-IS (99,60% \pm 0,1493), ADF/Cofilina-NI (84,10% \pm -5,900), ADF/Cofilina-IAS (95,85% \pm -1,374), ADF/Cofilina-IS (97,10% \pm 0,6884), RAB1-GTPase-NI (78,75% \pm -10,15), RAB1-GTPase-IAS (96,45% \pm 2,060), RAB1-GTPase-IS (96,80% \pm -2,271), LPS-NI (84,00% \pm 2,000), LPS-IAS (95,65% \pm -7,964) e LPS-IS (98,20% \pm -1,543) (Figura 16C).

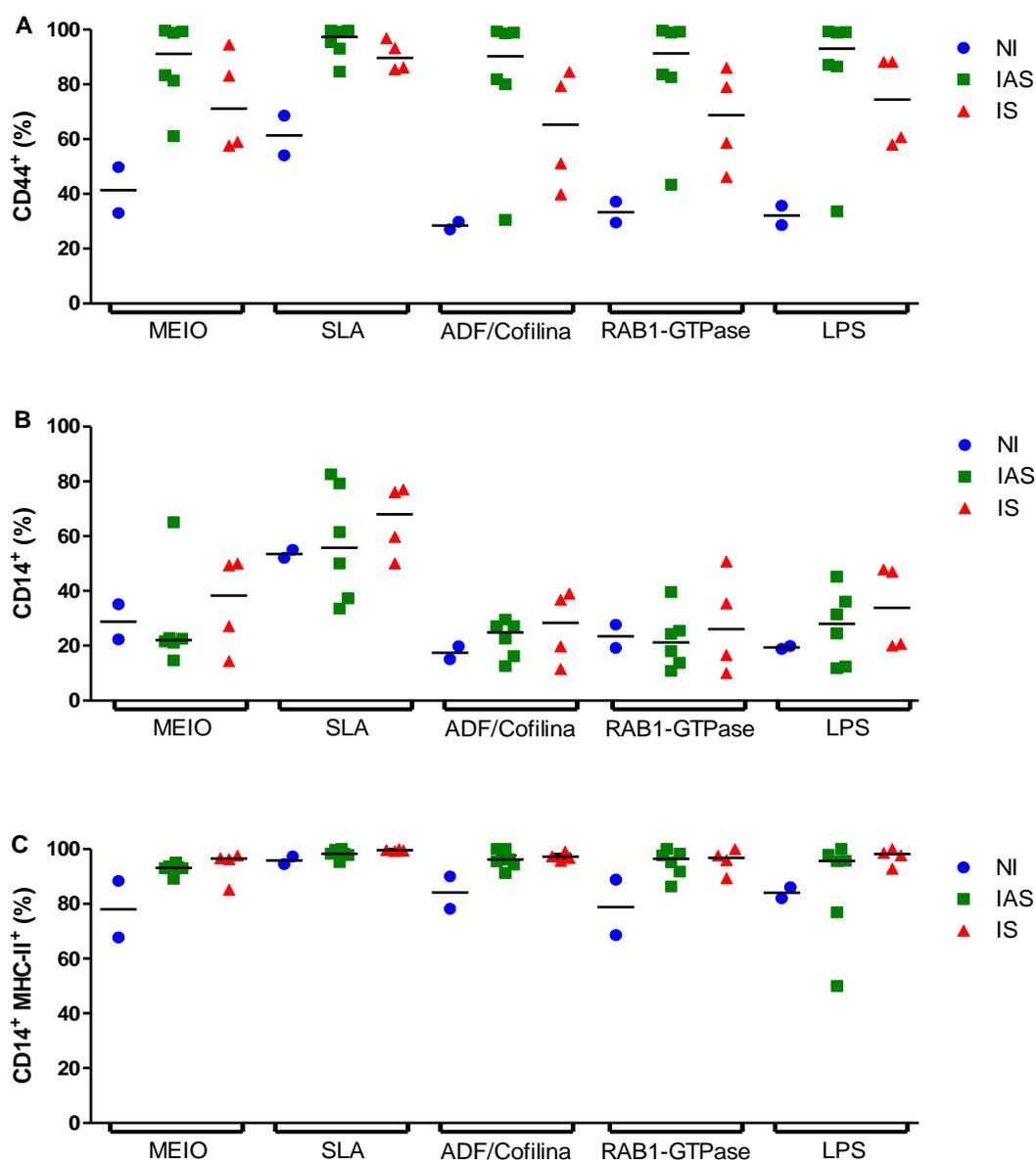


Figura 16. **Caracterização de monócitos após estimulação *In vitro*.** (A) Apresenta a quantificação em porcentagem de monócitos CD44+, assim como a figura (B) apresenta a

expressão de CD14 em monócitos e a figura (C) apresenta a quantificação da população CD14⁺MHC-II⁺, após 48 horas sob estímulo *In vitro* com MEIO, SLA, ADF/Cofilina, RAB1-GTPase, LPS. Cada ponto representa um indivíduo analisado (mediana +/- erro padrão).

Quanto à proporção de cada uma dessas moléculas na superfície celular (MFI) dos monócitos, após cada tratamento, foi possível observar tendência de diminuição na expressão de CD44 no grupo IS em comparação aos grupos NI e IAS. O mesmo padrão foi observado em todas as condições, iniciando com MEIO-NI (3798+/- 2414), MEIO-IAS (2639+/- 610,2), MEIO-IS (964,0+/- 544,0), SLA-NI (2185+/- 351,0), SLA-IAS (2602+/- 448,1), SLA-IS (1225+/- 258,1), ADF/Cofilina-NI (2482+/-1093), ADF/Cofilina-IAS (1722+/- 459,4), ADF/Cofilina-IS (887,5+/- 192,0), RAB1-GTPase-NI (3023+/- 1713), RAB1-GTPase-IAS (2395+/- 417,6), RAB1-GTPase-IS (776,0+/- 136,7), LPS-NI (2268+/-905,0), LPS-IAS (2781+/-532,4) e LPS-IS (806,5+/-248,8) (Figura 17A). Entretanto, para a molécula CD14, observou-se tendência à diminuição na expressão desta molécula no grupo IS, em comparação com os grupos NI e IAS. O mesmo padrão foi observado para todas as condições: MEIO-NI (4358+/- 3194), MEIO-IAS (6278+/- 582,5), MEIO-IS (2874+/-630,8), SLA-NI (2103+/-798,0), SLA-IS (1942+/- 306,6), SLA-IAS (3847+/-519,3), ADF/Cofilina-NI (5522+/-4093), ADF/Cofilina-IAS (5689+/-1009), ADF/Cofilina-IS (2900+/- 141,7), RAB1-GTPase-NI (5172+/- 3738), RAB1-GTPase-IAS (5251+/- 735,5), GTPase-IS (2736+/- 252,6), LPS-NI (4474+/-2956), LPS-IAS (4150+/-1048) e LPS-IS (2078+/-671,0) (Figura 17B). A expressão de MHC-II em células CD14⁺ uma tendência de aumento nos grupo IAS e manteve valores similares entre os grupos NI e IS, em todas as condições, como é possível observar nos seguintes valores: MEIO-NI (3189+/- 695,0), MEIO-IAS (9427+/-1407), MEIO-IS (2967+/-406,0), SLA-NI (1539+/- 484,5), SLA-IAS (4648+/-845,2), SLA-IS (2668+/-218,5), ADF/Cofilina-NI (3248+/- 652,0), ADF/Cofilina-IAS (8538+/-1255), ADF/Cofilina-IS (4512+/-457,2), RAB1-GTPase-NI (4029+/- 432,5), RAB1-GTPase-IAS (8811+/-1323), RAB1-GTPase-IS (4163+/-428,8),

LPS-NI (3138+/-791,5), LPS-IAS (9655+/-1424) e LPS-IS (3071+/-786,3).
(Figura 17C).

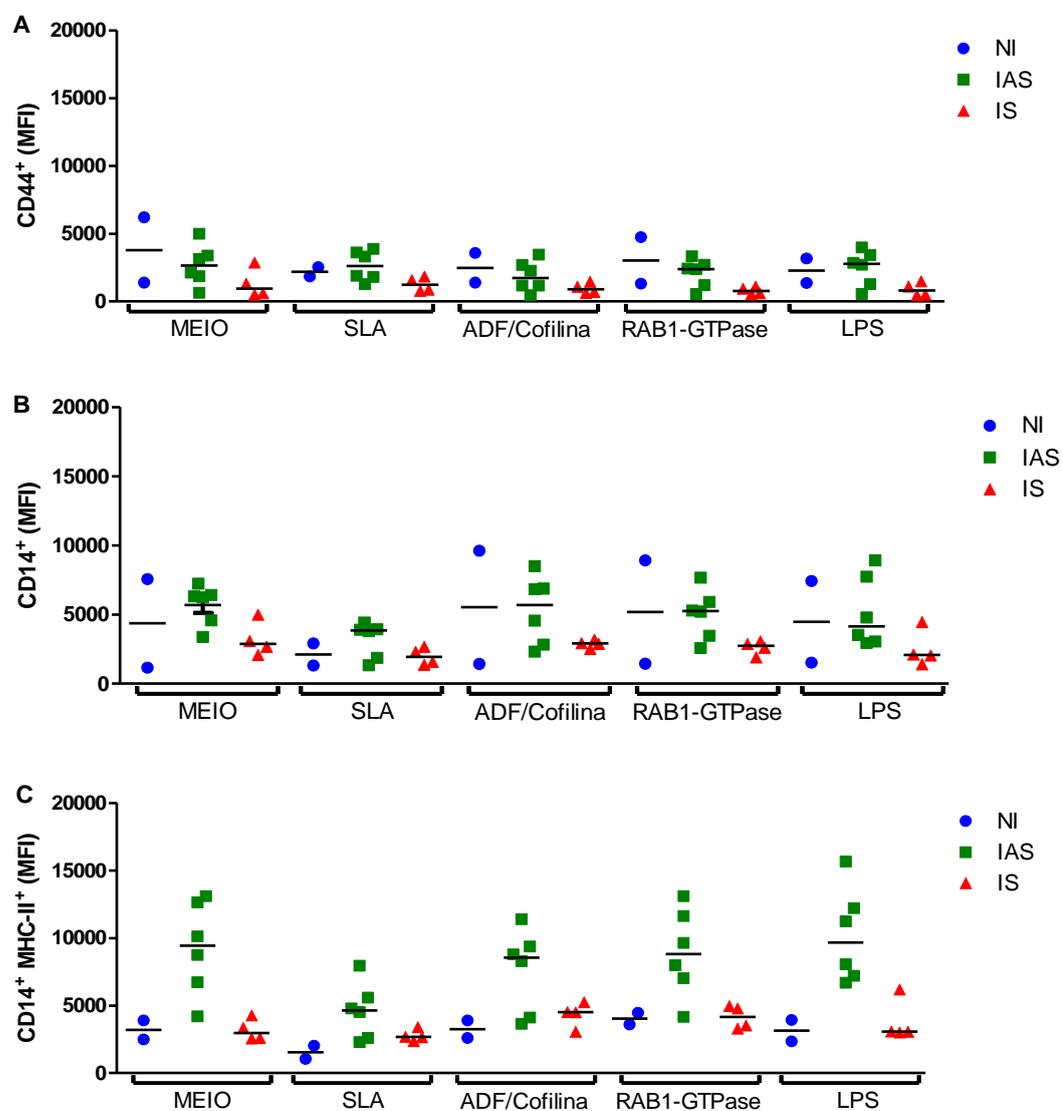


Figura 17. **Média de intensidade de Fluorescência (MFI) das moléculas expressas na superfície celular de monócitos, em abordagem *In vitro*.** (A) Representação da expressão da molécula CD44 mensurada para os grupos NI, IAS e IS sob os tratamentos com, MEIO, SLA, ADF/Cofilina, RAB1-GTPase e LPS. Da mesma maneira a figura (B) apresenta a expressão da molécula CD14 e a figura (C) apresenta a expressão de MHC-II em células CD14+, ambas sob as mesmas condições citadas acima. Cada ponto representa um indivíduo analisado (mediana +/- erro padrão).

5.9 Resposta de linfócitos à reestimulação *In vitro* com antígenos derivados de *L. infantum*

Após separação das PBMCs, as células foram reestimuladas em cultura com SLA e com as proteínas recombinantes ADF/Cofilina e RAB1-GTPase, por 48 horas. Posteriormente foram feitas as análises por citometria de fluxo com as moléculas de caracterização fenotípica de linfócitos T ativados e linfócitos B imaturos. Sobre a molécula CD19, observou-se uma tendência ao aumento da expressão desta molécula nos grupos tratados que no grupo controle, sendo que o grupo IS apresentou tendência de aumento mais pronunciado na quantidade de células marcadas que o grupo IAS. Os valores referentes a cada grupo são: MEIO-NI (26,05%±0,2500), MEIO-IAS (24,70%±3,925), MEIO-IS (33,40%±11,71), SLA-NI (37,20%±4,800), SLA-IAS (43,25%±10,26), SLA-IS (73,65%±11,31), ADF/Cofilina-NI (27,05%±2,150), ADF/Cofilina-IAS (28,40%±5,222), ADF/Cofilina-IS (56,80%±12,23), RAB1-GTPase-NI (26,25%±1,350), RAB1-GTPase-IAS (24,80%±6,638), RAB1-GTPase-IS (46,85%±12,31), LPS-NI (23,95%±2,650), LPS-IAS (23,45%±4,980) e LPS-IS (39,45%±11,80) (Figura 18A). Já a porcentagem da população CD19⁺CD25⁺, mostrou-se similar nos grupos IAS e IS, e em todas as condições, e apresentou uma tendência à diminuição no grupo NI. Os valores de cada grupo são: MEIO-NI (34,95%±9,250), MEIO-IAS (69,55%±5,775), MEIO-IS (74,35%±8,410), SLA-NI (28,35%±10,55), SLA-IAS (73,60%±6,596), SLA-IS (86,15%±5,365), ADF/Cofilina-NI (33,00%±21,70), ADF/Cofilina-IAS (72,90%±4,910), ADF/Cofilina-IS (79,50%±3,463), RAB1-GTPase-NI (28,35%±19,35), RAB1-GTPase-IAS (76,05%±4,675), RAB1-GTPase-IS (75,45%±4,720), LPS-NI (27,95%±14,75), LPS-IAS (77,20%±5,144) e LPS-IS (86,45%±6,126) (Figura 18B). Os linfócitos T, com marcação dupla CD4⁺CD25⁺, apresentaram tendência de aumento nas porcentagens dos grupos IS que nos NI e IAS, em todas as condições, com os valores: MEIO-NI (48,30%±8,800), MEIO-IAS (16,80%±6,678) MEIO-IS (57,75%±15,16), SLA-NI (29,45%±17,55), SLA-IAS (42,00%±13,41), SLA-IS

(83,55% \pm 16,12), ADF/Cofilina-NI (22,86% \pm 17,84), ADF/Cofilina-IAS (25,40% \pm 25,40), ADF/Cofilina-IAS (77,40% \pm 13,40), RAB1-GTPase-NI (23,24% \pm 23,24), RAB1-GTPase-IAS (18,40% \pm 8,633), RAB1-GTPase-IS (74,25% \pm 14,51), LPS-NI (22,98% \pm 17,93), LPS-IAS (19,20% \pm 8,893) e LPS-IS (79,65% \pm 14,22) (Figura 18C).

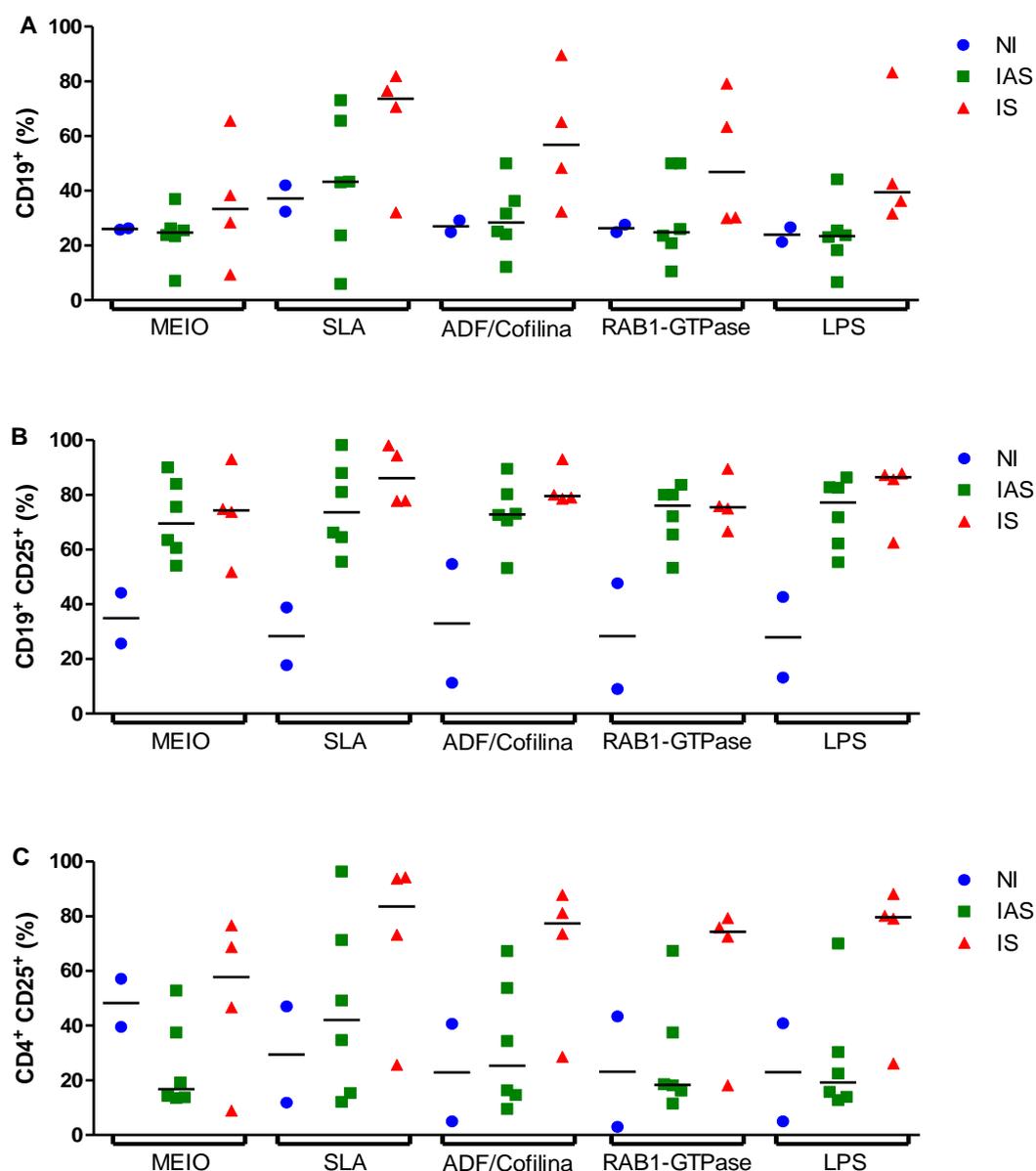


Figura 18. **Caracterização de linfócitos T e B após estimulação *In vitro*.** A figura (A) representa a porcentagem de linfócitos B expressando as moléculas CD19, nos grupos IAS

e IS nas condições: MEIO, SLA, com as proteínas recombinantes ADF/Cofilina e RAB1-GTPase e com LPS. Em (B) observa-se a porcentagem de linfócitos duplo positivos expressando CD4 e CD25 e em (C) linfócitos B expressando CD19 CD25, nos grupos IAS e IS nos tratamentos MEIO, SLA, ADF/Cofilina, RAB1-GTPase e LPS. Cada ponto representa um indivíduo (mediana +/-erro padrão).

Quanto à proporção de cada uma dessas moléculas na superfície celular (MFI) dos linfócitos T e B, foi possível observar, em todas as condições, uma tendência de aumento na expressão de CD19 nos grupos dos IAS, quando em comparação com os demais. Entretanto, nas primeiras duas condições (MEIO e SLA) os grupos NI e IS apresentaram valores similares, enquanto que nas duas últimas condições (ADF/Cofilina e RAB1-GTPase), o grupo IS apresentou uma tendência de aumento na expressão de CD19, quando em comparação com o grupo NI. É possível identificar tais diferenças observando os valores de cada grupo: MEIO-NI (2795 +/- 615,5), MEIO-IAS (5330 +/- 1203), MEIO-IS (2094 +/- 368,4), SLA-NI (3946 +/- 942,5), SLA-IAS (6112 +/- 668,9), SLA-IS (3155 +/- 225,8), ADF/Cofilina-NI (4918 +/- 473,5), ADF/Cofilina-IAS (2607 +/- 986,2), ADF/Cofilina-IS (1835 +/- 248,5), RAB1-GTPase-NI (5495 +/- 405,0), RAB1-GTPase-IAS (4147 +/- 1910), RAB1-GTPase-IS (1395 +/- 160,5), LPS-NI (4567 +/- 273,0), LPS-IAS (5893 +/- 1512) e LPS-IS (2171 +/- 394,3) (Figura 19A). Observou-se ainda que a expressão de CD25 na população de células CD19⁺, manteve-se baixa em quase todos os grupos e condições, exceto os grupos MEIO-NI, MEIO-IS e RAB1-GTPase-NI, que apresentaram uma tendência de aumento em seus valores, quando em comparação com os demais. Sendo observados os seguintes valores: MEIO-NI (2877 +/- 1841), MEIO-IAS (1393 +/- 169,8), MEIO-IS (1194 +/- 1620), SLA-NI (1053 +/- 158,5), SLA-IAS (1799 +/- 196,2), SLA-IS (1680 +/- 238,7), ADF/Cofilina-NI (1192 +/- 125,0), ADF/Cofilina-IAS (1352 +/- 153,0), ADF/Cofilina-IS (1249 +/- 236,1), RAB1-GTPase-NI (2598 +/- 1634), RAB1-GTPase-IAS (1319 +/- 146,6), RAB1-GTPase-IS (1337 +/- 562,3), LPS-NI (1152 +/- 97,50), LPS-IAS (1316 +/- 189,3) e LPS-IS (1485 +/- 242,0) (Figura 19B). A molécula CD25, expressa em células CD4⁺, apresentou expressão equivalente na maioria dos grupos, exceto dos grupos MEIO-NI e RAB1-

GTPase-NI, que apresentaram uma tendência de aumento nos valores, em comparação com os demais grupos de seus respectivos tratamentos. Tais diferenças observam-se nos valores a seguir: MEIO-NI (3842+/-2742), MEIO-IAS (1438+/- 161,9), MEIO-IS (1289+/- 212,5), SLA-NI (927,0+/- 0,0), SLA-IAS (1877+/- 411,6), SLA-IS (1660+/- 174,9), ADF/Cofilina-NI (1253+/- 131,5), ADF/Cofilina-IAS (1346+/- 188,1), ADF/Cofilina-IS (1442+/- 367,5), RAB1-GTPase-NI (7000+/-5683), RAB1-GTPase-IAS (1732+/- 172,7), RAB1-GTPase-IS (1525+/- 383,0), LPS-NI (1711+/-158,0), LPS-IAS (1602+/- 194,5) e LPS-IS (1011+/-335,8) (Figura 19C).

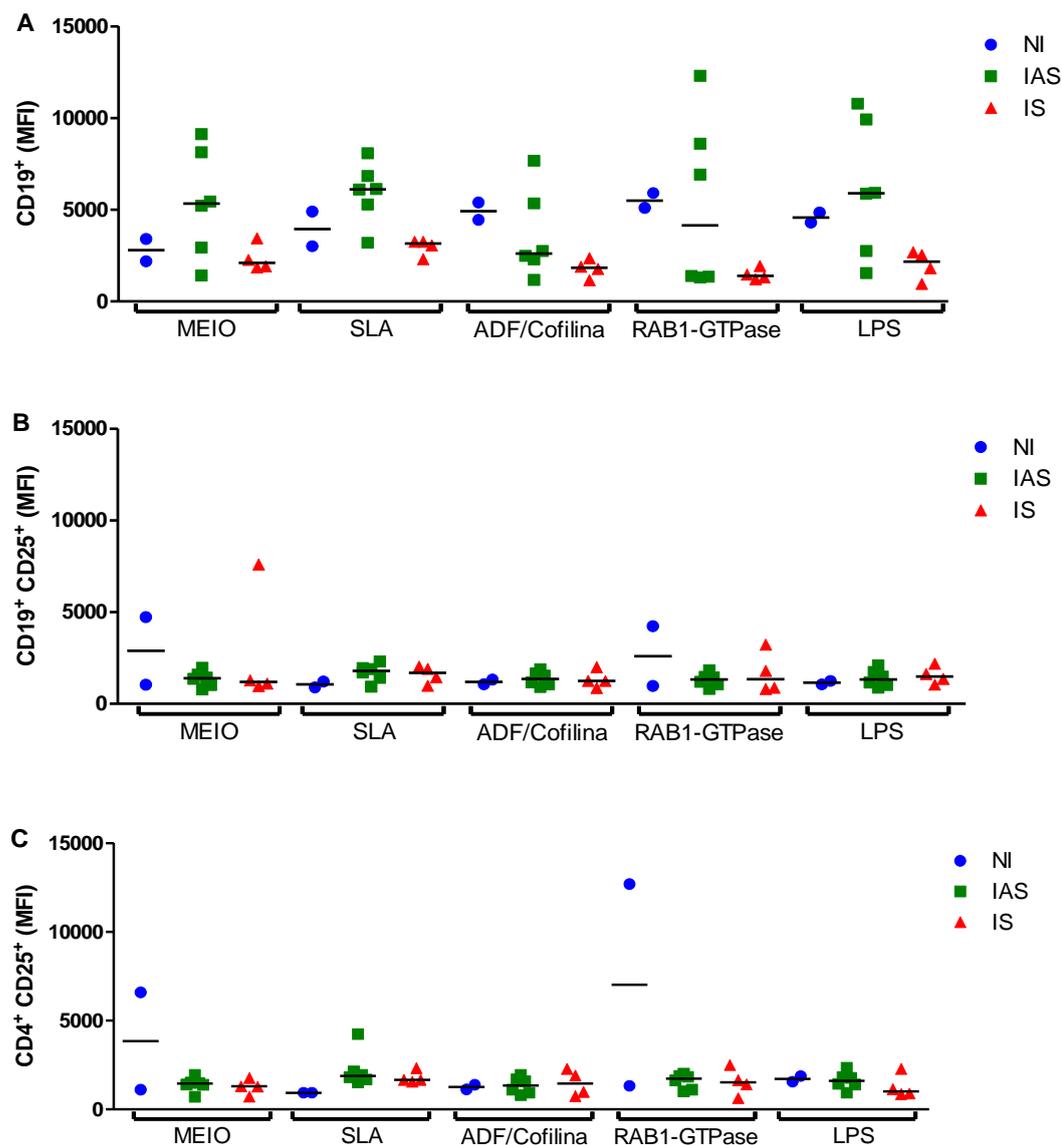


Figura 19. Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de moléculas expressas em linfócitos T e B na abordagem *In vitro*. (A) Representa a expressão da molécula CD19 em linfócitos B, de cães dos grupos NI, IAS e IS, nas condições tratadas com MEIO, com SLA e com as proteínas recombinantes ADF-Cofilina, RAB1-GTPase e LPS. Já a figura (B) representa a expressão de CD25 em células T CD4⁺ e (C) a expressão de CD25 em células CD25⁺ dos grupos NI, IAS e IS nos mesmos tratamentos citados acima. Cada ponto representa um indivíduo (mediana +/- erro padrão).

Já para caracterização e identificação das proporções de células nas populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, foram marcadas as células CD3⁺

e dentro dessa população foram marcadas as células CD4⁺ e CD8⁺. A porcentagem de células CD3⁺ CD4⁺ mostrou-se com uma tendência de aumento similar entre os grupos IAS e IS, em relação ao grupo NI. Os valores referentes a cada grupo são os seguintes: MEIO-NI (22,30%±0,600), MEIO-IAS (51,25%±6,821), MEIO-IS (76,50%±13,10), SLA-NI (28,35%±0,350), SLA-IAS (54,60%±8,906), SLA-IS (84,75%±16,98), ADF/Cofilina-NI (27,00%±1,800), ADF/Cofilina-IAS (52,45%±7,248), ADF/Cofilina-IS (74,05%±15,63), RAB1-GTPase-NI (26,25%±4,650), RAB1-GTPase-IAS (49,25%±7,008), RAB1-GTPase-IS (76,70%±15,02), LPS-NI (23,40%±0,800), LPS-IAS (54,35%±6,284) e LPS-IS (77,65%±6,049) (Figura 20A). Já a porcentagem de células CD3⁺ CD8⁺, mostrou-se com uma tendência ao aumento nos grupos dos IS em comparação aos IAS, e ambos apresentaram uma tendência de aumento em relação aos grupos NI, em todas as condições. Os grupos apresentaram os seguintes valores: MEIO-NI (34,51%±26,59), MEIO-IAS (35,85%±8,266), MEIO-IS (69,75%±16,58), SLA-NI (41,50%±27,40), SLA-IAS (49,90%±10,81), SLA-IS (90,60%±14,64), ADF/Cofilina-NI (36,70%±27,50), ADF/Cofilina-IAS (42,25%±8,742), ADF/Cofilina-IS (81,65%±5,133), RAB1-GTPase-NI (40,85%±24,55), RAB1-GTPase-IAS (54,55%±10,72), RAB1-GTPase-IS (86,65%±4,440), LPS-NI (40,20%±26,00), LPS-IAS (35,35%±8,627), LPS-IS (84,50%±14,04) (Figura 20B).

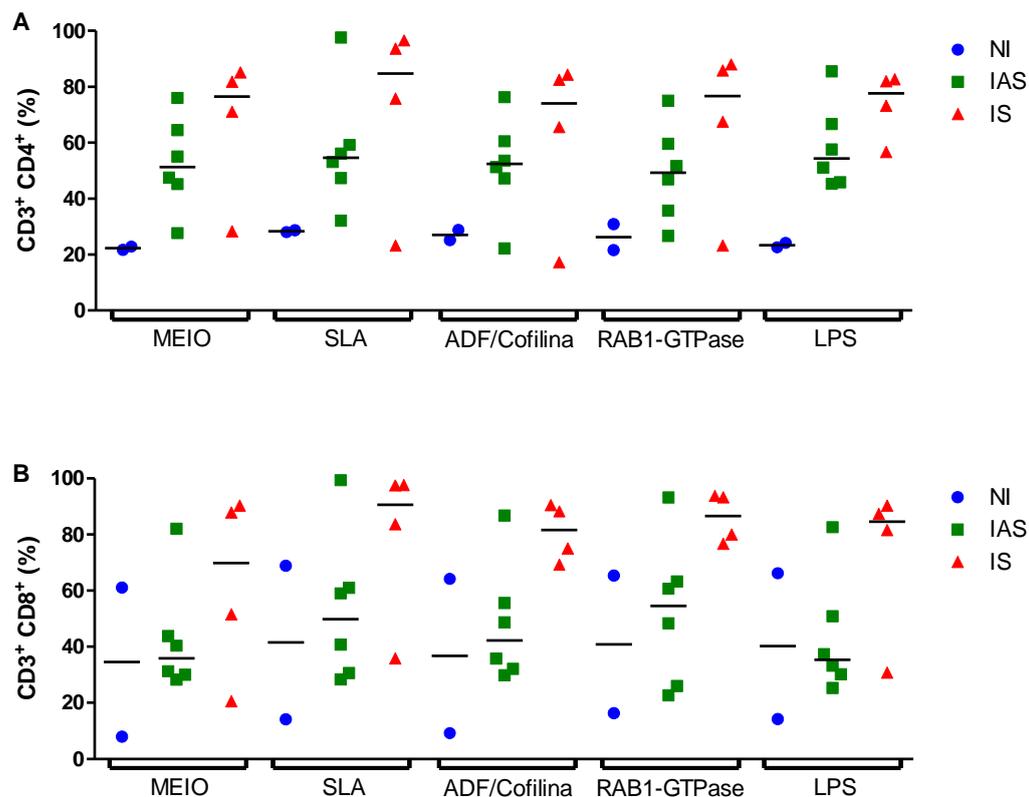


Figura 20. **Caracterização das populações linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ após estímulo *In vitro*.** A figura (A) representa a porcentagem de linfócitos CD3⁺ CD4⁺, os linfócitos TCD4⁺, e em (B) a porcentagem de linfócitos CD3⁺CD8⁺, linfócitos TCD8⁺, ambos nos grupos IAS e IS após os tratamentos com MEIO, SLA, ADF/Cofilina, RAB1-GTPase e LPS. Cada ponto representa um indivíduo (mediana +/-desvio padrão).

Quanto à proporção de moléculas CD4 na superfície celular dos linfócitos T CD4⁺, analisada por MFI, foi observada uma tendência ao aumento da expressão dessa molécula nos grupos IAS e uma tendência à diminuição nos grupos IS, quando em comparação com o grupo NI. Os grupos apresentaram os seguintes valores: MEIO-NI (3055+/- 1742), MEIO-IAS (5652+/- 1250), MEIO-IS (1889+/- 1993), SLA-NI (2650+/- 1459), SLA-IAS (4878+/- 1118) SLA-IS (733,5+/- 1243), ADF/Cofilina-NI (4012+/- 2525), ADF/Cofilina-IAS (8392+/- 1266), ADF/Cofilina-IS (2308+/- 1582), RAB1-GTPase-NI (2931+/- 1696), RAB1-GTPase-IAS (7911+/- 1329), RAB1-GTPase-IS (1406+/- 465,2), LPS-NI (3220+/- 1955), LPS-IAS (7605+/- 1462),

LPS-IS (1706+/- 819,2) (Figura 21A). Já quanto à proporção de moléculas CD8 na superfície celular dos linfócitos T CD8⁺, analisada por MFI, foi observada uma tendência ao aumento da expressão dessa molécula nos grupos IAS e uma tendência à diminuição nos grupos IS, quando em comparação com o grupo NI. Os grupos apresentaram os seguintes valores: MEIO-NI (2449+/- 1339), MEIO-IAS (3498+/- 2552), MEIO-IS (1917+/- 696,4), SLA-NI (2495+/- 1731), SLA-IAS (2745+/- 2608) SLA-IS (1754+/- 473,2), ADF/Cofilina-NI (3471+/- 365,0), ADF/Cofilina-IAS (5372+/- 2597), ADF/Cofilina-IS (1719+/- 152,1), RAB1-GTPase-NI (4573+/- 636,0), RAB1-GTPase-IAS (5499+/- 2319), RAB1-GTPase-IS (1650+/- 310,1), LPS-NI (3715+/- 436,0), LPS-IAS (8107+/- 2554), LPS-IS (2248+/- 208,8) (Figura 21B).

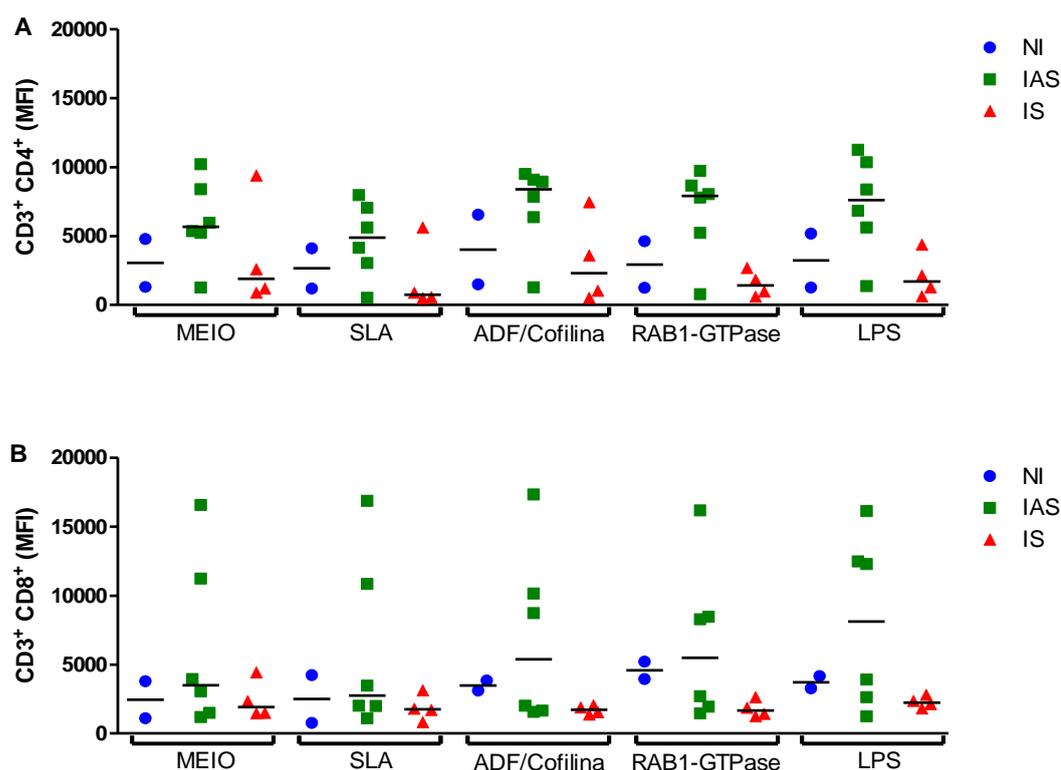


Figura 21. Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de moléculas expressas em linfócitos T CD4⁺ T CD8⁺ na abordagem *In vitro*. (A) Representa a expressão da molécula CD4 em linfócitos T CD4⁺, de cães dos grupos NI, IAS e IS, nas condições com MEIO, com

SLA e com as proteínas recombinantes ADF-Cofilina, RAB1-GTPase e LPS. Já a figura (B) representa a expressão de CD8 em células CD3⁺CD8⁺ nos grupos NI, IAS e IS nas mesmas condições citadas acima. Cada ponto representa um indivíduo (mediana +/-erro padrão).

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral canina apresenta um grande espectro de alterações clínico-patológicas, variando desde uma infecção assintomática até uma doença grave que pode levar à morte⁽¹⁶⁵⁾. O perfil de resistência à infecção está associado ao desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células, principalmente linfócitos TCD4 e TCD8, enquanto que o perfil de suscetibilidade está associado à produção de altos níveis de anticorpos⁽¹⁶⁶⁾. No entanto, os mecanismos que controlam o equilíbrio entre suscetibilidade e resistência, sejam eles mecanismos patológicos ou imunes, ainda são pouco conhecidos. A caracterização das células envolvidas nesses processos pode ser importante para a identificação de prognósticos e monitoramento de cães infectados, e ainda para a melhoria no desenvolvimento de imunoprofilaxias e abordagens terapêuticas.

Neste trabalho, foram utilizadas amostras de cães com LVC, naturalmente infectados, sintomáticos (IS) e assintomáticos (IAS), e cães não infectados (NI) do DF. Foram avaliadas as características de linfócitos T (TCD8⁺ e TCD4⁺), linfócitos B e monócitos, *ex vivo*, de acordo com os grupos de estudo (NI, IAS e IS) para avaliação da proporção dessas células em cada grupo e da expressão de algumas moléculas de superfície. Portanto, o intuito foi observar se há padrões entre os cães do mesmo grupo de estudo e quais são as diferenças entre os grupos. Essa abordagem visa auxiliar na identificação de biomarcadores que indiquem suscetibilidade ou resistência em cães com LVC. Além disso, foram feitas análises, *In vitro*, para observar se as proteínas recombinantes escolhidas para o estudo poderiam ser boas candidatas para o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico rápido (DPP) com melhor acurácia, quando em comparação com os atualmente disponíveis.

A porcentagem de cães infectados sintomáticos neste estudo foi de 33,3% (Tabela 3). Os sinais clínicos observados neste grupo foram elencados na Tabela 4. Em outros estudos, foi detectado um perfil de resposta celular que promove a secreção de TGF- β e IL-4, citocinas anti-inflamatórias que promovem o perfil Th2 e a manutenção de uma resposta humoral importante, que por sua vez está relacionada aos sinais clínicos da doença ^(51,167,168). A deposição de imunocomplexos é um dos principais causadores dos sinais clínicos de LVC. Os linfócitos Treg estão relacionados ao desenvolvimento do perfil Th2 em cães infectados sintomáticos, pois são também produtoras de IL-10 e TGF- β . A produção destas citocinas anti-inflamatórias inibe ainda a ativação do metabolismo oxidativo de macrófagos e a diferenciação de células T no perfil Th1, inibindo então a resposta imune protetora e auxiliando na manutenção e proliferação do parasito no hospedeiro ⁽¹⁶⁹⁾. Em concordância com esses dados, foi demonstrada uma maior carga parasitária em cães sintomáticos que em cães assintomáticos, principalmente nos tecidos do baço, da pele e da medula óssea ⁽⁶¹⁾.

No presente estudo, 40% das amostras de cães infectados eram assintomáticos (Tabela 3). Segundo Reis e colaboradores, cães assintomáticos apresentam altos níveis de IFN- γ , relacionado à manutenção de uma resposta protetora, do perfil Th1, que evita o desenvolvimento dos sinais clínicos ⁽⁶¹⁾. Além disso, há proliferação de linfócitos T CD4⁺ e ativação de linfócitos T CD8⁺ em cães assintomáticos infectados por *L. infantum*, o que gera a resposta protetora nesses indivíduos (51,170). Desse modo, a proporção de citocinas e células envolvidas nos perfis Th1 e Th2 diferencia os cães assintomáticos dos sintomáticos ⁽¹⁷¹⁾, e fatores como a variação genética, características fenotípicas e ambientais, podem influenciar o desenvolvimento da resposta imune do indivíduo em relação à doença ^(61,169).

As características fenotípicas, de raça, sexo e idade dos cães podem estar relacionadas à variação dos leucócitos e suas proporções em cada indivíduo. O trabalho de Faldyna e colaboradores evidencia tais diferenças

em estudo, no qual descreveram que a distribuição de linfócitos no sangue periférico de cães varia de acordo com a idade. Observaram também que a porcentagem de linfócitos B, em cães saudáveis, diminuiu de acordo com o avanço da idade, enquanto que linfócitos T CD8⁺ aumentaram no decorrer da idade dos cães, ao passo que linfócitos TCD4⁺ não apresentaram mudanças significantes. Porém, os autores observaram diferenças significantes nas porcentagens de linfócitos entre as diferentes raças observadas, que foram Beagle, Pastor Alemão, Dálmata e Dachshunds. Por fim, demonstraram diferentes proporções de neutrófilos no sangue periférico entre esses indivíduos. Entretanto, na comparação entre os sexos não encontraram diferenças significantes em relação à porcentagem de cada população de linfócitos T e B ⁽⁹⁹⁾. Contudo, as amostras do presente estudo apresentam indivíduos pertencentes a faixas etárias distintas, e na sua grande maioria, não possuem raça definida (72,7%) (Tabela 5). Esse fato é relevante, pois a variabilidade genética e a diversidade de fenótipos encontradas nessa amostra podem estar relacionadas ao padrão de resposta imune diferente entre indivíduos. Dessa forma, é provável que as diferenças observadas nas características dos leucócitos entre indivíduos, mesmo os pertencentes ao mesmo grupo, estejam relacionadas também às características específicas de idade, raça e sexo.

O local de origem do cão também é uma característica importante, pois sendo a LVC uma doença parasitária transmitida por vetor, questões ambientais podem aumentar a probabilidade dos cães serem infectados. A maioria dos cães pertencentes ao grupo infectado de nossa amostra são oriundos das três regiões administrativas do DF com as maiores quantidades de casos confirmados de LVC ⁽¹⁷²⁾. Tal resultado pode estar relacionado à alta incidência dessa doença nessas regiões, como observado em um levantamento feito por Herênio e colaboradores dos dados do CCZ de Brasília, no período de Janeiro a Outubro de 2013 com o total de 6.422 cães, foram identificados 114 casos confirmados em Sobradinho, 108 no Lago Norte e 102 na Fercal ⁽¹⁷²⁾. As regiões administrativas de Sobradinho e Lago Norte apresentaram as maiores incidências da doença no DF, sendo 19,3 e

18,3%, respectivamente ⁽¹⁷²⁾. Neste estudo, 36,3% da amostra de cães infectados, sintomáticos e assintomáticos, foram provenientes de Sobradinho, 23,3% do Lago Norte e 18,2% da Fercal (Tabela 6). Tais resultados condizem com a alta quantidade de casos confirmados de LVC no trabalho de Herênio e colaboradores ⁽¹⁷²⁾. Os autores identificaram que essas regiões administrativas possuem ainda muita vegetação, são locais úmidos, com sombreamento e matéria orgânica, características que beneficiam o aumento da população do vetor *Lutzomyia longipalpis*, principalmente nos períodos de chuva. Isso pode explicar a maior incidência de LVC nesses locais, com Sobradinho apresentando o maior número de casos confirmados de LVC no DF ⁽¹⁷²⁾. Um estudo, de Carvalho e colaboradores, corrobora essa informação, apontando maior incidência de *Lutzomyia longipalpis* em Sobradinho, concomitantemente com a maior incidência de casos LV em humanos ⁽¹⁷³⁾. Além disso, estudos defendem que a maioria dos cães em áreas endêmicas estão infectados e que a prevalência da infecção é bem maior que o número de casos relatados da doença ^(50,174). Todavia, uma limitação do presente estudo deve-se ao fato de que, nas análises dos prontuários, faltavam informações a respeito da região administrativa de origem dos animais da amostra.

Na tentativa de obtenção de PBMCs, após a separação por gradiente de densidade com apenas uma fase de Ficoll, observou-se que não houve pureza de células mononucleares com essa metodologia, pois identificou-se uma alta proporção de células polimorfonucleares (PNMs) que, pela morfologia, sugere-se que sejam neutrófilos (Figura 8). O protocolo utilizado foi descrito por Trajano-Silva ⁽¹⁶³⁾ e foi adotado ainda em outros estudos com cães ^(74,110,175,176). Buurman e colaboradores, no entanto, descreveram a similaridade na densidade de neutrófilos e linfócitos caninos, característica essa que não permite a separação dessas populações por gradiente de densidade de uma fase ⁽¹⁷⁷⁾. Essa técnica é comumente utilizada na obtenção de PBMCs humanos e de outros animais, como ruminantes, roedores e porcos ⁽¹⁷⁸⁻¹⁸⁰⁾. No entanto, para cães pode haver uma contaminação significativa de PNMs com a utilização desta técnica ⁽¹⁸¹⁾. Além

disso, os neutrófilos compreendem a maior proporção de leucócitos caninos, chegando a mais de 60% ⁽¹⁸¹⁾, o que intensifica a dificuldade na separação dessa população celular.

Na abordagem *ex vivo*, foi analisada a expressão de moléculas de superfície de monócitos e linfócitos dos três grupos de estudo (NI, IAS e IS), sem tratamentos, para caracterização fenotípica dessas populações celulares. A primeira molécula analisada, o CD44, apresentou uma porcentagem de células CD44⁺ similar entre os grupos, sendo que apenas o IAS apresentou uma tendência à diminuição de células positivas, ainda assim, apresentando 69% de positividade (Figura 12A). A molécula CD44 é altamente conservada em leucócitos de mamíferos e pertence à família de moléculas de adesão da superfície celular, envolvidas em interações entre células e entre uma célula e uma matriz ⁽¹⁸²⁾. Assim, é esperado que a maioria dos monócitos caninos apresente marcação da molécula CD44, como observado nos resultados, ainda que em indivíduos de grupos diferentes. No entanto, as células CD44⁺ em cães IS mostraram menor MFI dessa molécula que os demais grupos, apresentando diminuição significativa do grupo IS em relação ao NI (Figura 12D). A expressão dessa molécula parece ser obrigatória para a migração de DCs dos sítios de infecção para o linfonodo, permitindo que haja a apresentação de antígenos aos linfócitos ⁽¹⁸³⁾. Dessa forma, a menor presença dessa molécula em monócitos de cães IS pode indicar função de apresentação de antígenos comprometida neste grupo, quando em comparação ao grupo NI.

A alta expressão da molécula CD44 também em linfócitos T é característica de ativação dessas células após o encontro com o antígeno cognato ⁽¹⁸²⁾. A expressão dessa molécula na superfície celular de linfócitos T está associada à sua capacidade de aderir ao endotélio vascular permitindo que haja a diapedese e entrada do linfócito T ativado no sítio de infecção, em humanos ⁽¹⁸⁴⁾ e camundongos ⁽¹⁸⁵⁾. Uma limitação do presente estudo foi a impossibilidade de marcar a molécula CD44 em linfócitos, em decorrência da sobreposição de fluorescências devido à limitada gama de fluorescências disponíveis.

Em seguida, foi feita a identificação de monócitos circulantes, uma vez que esta população desempenha um importante papel quando nos focos inflamatórios, já diferenciados em macrófagos ativados, que são capazes de fagocitar e eliminar os parasitos por meio da ativação do metabolismo oxidativo destas células. Tais células foram analisadas por meio da marcação da molécula CD14, já que a molécula CD14 é em geral utilizada na identificação de monócitos ⁽¹⁰¹⁾. Foi observada nos resultados uma tendência à diminuição da porcentagem de células CD14⁺ no grupo IS (27,90%) em relação aos outros dois grupos, IAS (39%) e NI (34,45%) (Figura 12B). Porém, o MFI da molécula CD14 apresentou uma tendência à diminuição nos grupos IAS e IS em comparação com o grupo NI (Figura 12E). Esses resultados apresentam-se em concordância com o estudo de Reis e colaboradores, que observaram menor porcentagem de monócitos CD14⁺ circulantes em sangue periférico no grupo IS que no grupo NI ⁽⁶¹⁾. A redução da porcentagem de monócitos CD14⁺ circulantes, em cães IS, sugere que os monócitos migram para os sítios de infecção, onde eles atuam como APC, o que evidencia seu papel fundamental no controle da infecção ^(61,165). Entretanto, neste trabalho, a tendência à baixa porcentagem de monócitos no *gate* selecionado (Figuras 9 e 12B) pode ser devido à contaminação da separação de PBMCs observada, de modo que uma porcentagem da população considerada neste *gate* pode ser composta por neutrófilos, já que ambos apresentam granulosidade similares ⁽¹⁰³⁾.

Ainda na população CD14⁺, observou-se uma tendência à diminuição na proporção de células MHC-II⁺ nos grupos IAS e IS quando em comparação com o grupo NI (Figura 12C), além disso, houve uma tendência de diminuição da MFI dessa molécula no grupo IS em relação aos grupos NI e IAS (Figura 12F). Essa característica nos grupos NI e IAS poderia facilitar a apresentação de antígenos aos linfócitos, nos grupos que apresentam a resposta imune polarizada para o perfil Th1. Resultados similares foram apresentados em outro estudo, com maior expressão de molécula MHC-II em cães NI e IAS que em cães IS, o qual apresenta menor expressão dessa molécula ⁽⁶¹⁾, fato que poderia comprometer a função de apresentação de

antígenos no grupo IS.

Reis e colaboradores observaram uma baixa frequência de monócitos circulantes em cães com LVC, apresentando-se como uma característica marcante da doença, o que corrobora com os resultados encontrados na Figura 12F ⁽⁶¹⁾. No entanto, algumas células não apresentaram marcação duplo positiva, o que também foi observado em outros estudos, que descreveram então três subgrupos de monócitos, são eles: CD14⁻MHC⁺, CD14⁺MHC⁺ e CD14⁺MHC⁻ ^(102,103). Segundo Gibbons e colaboradores, os monócitos CD14⁻MHC⁺ seriam os equivalentes aos monócitos humanos não clássicos, os CD14⁺MHC⁺ aos intermediários e CD14⁺MHC⁻ aos monócitos clássicos ⁽¹⁰²⁾. Entretanto, por conta das diferenças entre espécies e a presença de marcadores distintos, a comparação entre monócitos humanos e caninos pode ser incerta ⁽¹⁰³⁾.

Neste estudo, os resultados relativos à porcentagem de linfócitos B CD19⁺, *ex vivo*, mostraram mediana baixa em todos os grupos (Figura 13A). No entanto, os grupos infectados apresentaram tendência de aumento na porcentagem de células CD19⁺, quando em comparação com o grupo NI (Figura 13A), assim como tendência de aumento na expressão desta molécula, já que na análise de MFI o grupo IS apresentou a tendência de aumento na expressão da molécula CD19 em comparação com os demais grupos (Figura 13D). Um padrão oposto foi observado nas células CD19⁺CD25⁺, tanto em relação à porcentagem de células como ao MFI (Figuras 13B e 13E). Tais resultados poderiam ser utilizados como marcadores de prognóstico, tendo em vista que a tendência de aumento dos níveis de linfócitos B poderiam indicar ativação, proliferação dessas células e alta produção de anticorpos. Entretanto, esses resultados apresentam-se contrastantes aos estudos de Reis e colaboradores, que observaram uma diminuição de linfócitos B circulantes em cães IS em comparação com os IAS e NI. Ao mesmo tempo, observaram maior produção de anticorpos: IgG, IgG2, IgM, IgE e IgA ⁽⁶¹⁾. Essa diminuição de linfócitos B circulantes e alta produção de anticorpos podem ser explicadas pela diferenciação dessas células em plasmócitos e migração para órgãos como a medula óssea,

quando então dão início à atividade policlonal dos linfócitos B ⁽¹⁸⁶⁾.

Uma resposta humoral pronunciada contra a *Leishmania* causa uma produção de altos níveis de anticorpos não protetores ^(187,188) e até anticorpos autoimunes ⁽¹⁸⁹⁾, como antiactina, antitubulina ⁽¹⁹⁰⁾ e antinuclear ⁽¹⁹¹⁾. Esses dados caracterizam a resposta policlonal de linfócitos B como uma característica de susceptibilidade à LVC e ao desenvolvimento dos sinais clínicos característicos da doença ⁽¹⁸⁹⁾.

A população CD4⁺CD25⁺, por sua vez, apresentou baixa porcentagem, chegando até a 20% nos NI, e menores porcentagens nos demais grupos (Figura 13C). Porém, o MFI apresentou expressão similar da molécula CD25, nas células CD4⁺, em todos os grupos (Figura 13F). Em humanos e camundongos as células CD4⁺CD25⁺, são em geral identificadas como linfócitos T regulatórios (Treg), geralmente marcados ainda com Foxp3 (CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺) ^(192,193), que apresentam a função de regular ambas as respostas Th1 e Th2 ⁽⁹²⁾. No entanto, uma alta expressão de CD25 pode ainda indicar linfócitos T ativados, quando em conjunto com outras marcações, como CD44^{high} e CD45RO^{high} que caracterizariam por completo essas células. A falta desses marcadores específicos no estudo e a dificuldade de encontrar tais marcadores para cães apresentaram-se como uma limitação deste trabalho.

Nos resultados relativos à população de linfócitos T CD4⁺, verificou-se porcentagens similares de células CD3⁺CD4⁺ nos três grupos: 39% no NI, 37% no IAS e 34% no IS (Figura 14A). No estudo do grupo de pesquisa de Reis, observaram uma diminuição de células T CD4⁺ no grupo dos IS em relação aos demais grupos ⁽⁶¹⁾ observando-se então uma depleção de linfócitos T CD4⁺. Tal depleção pode estar associada à resposta protetora não efetiva contra o parasito, apesar da presença de linfócitos T CD8⁺ em cães infectados, pois a ausência de linfócitos T CD4⁺ impede o desenvolvimento da ação efetora de células T CD8⁺, que parece ser dependente de IFN- γ , possibilitando a progressão da doença ^(175,194). Dessa forma, a linfopenia está relacionada ao perfil imunossupressor em cães infectados por *L. infantum* ^(120,165). Essa e outras leucopenias podem estar

associadas ainda ao bloqueio de maturação das linhas leucocitárias, por conta da alta carga parasitária e subsequente recrutamento dessas células para os sítios da inflamação com o objetivo de controlar a infecção local, causando uma diminuição dos leucócitos circulantes ⁽¹¹⁸⁾.

No entanto, a expressão de moléculas CD4, na análise de MFI, apresentou um aumento significativo desta molécula no grupo IS em relação ao grupo IAS (Figura 14C). A função da molécula CD4 durante a infecção está relacionada à ativação de linfócitos, entretanto, essa molécula é amplamente expressa em outros leucócitos caninos, como monócitos e neutrófilos, e sua função parece ainda ser pouco conhecida e subestimada nestes leucócitos ⁽¹⁰³⁾.

Nos resultados relativos à população de linfócitos TCD8⁺, foi verificada tendência de aumento na porcentagem de células CD3⁺CD8⁺ no grupo IS em comparação ao grupo IAS (Figura 14B). Tal resultado contradiz os dados descritos no trabalho de Reis e colaboradores, no qual foi observada uma maior porcentagem de células TCD8⁺ em cães IAS que em cães IS, sugerindo então que altos níveis de células TCD8⁺ podem ser uma característica dos cães assintomáticos ⁽⁶¹⁾.

Já em humanos, identifica-se uma depleção, causada por anergia ou exaustão, dos linfócitos TCD8⁺ circulantes em casos de VL, fato que deve afetar a capacidade protetora da resposta imune dos indivíduos, talvez podendo ser utilizado como um marcador de susceptibilidade ⁽¹⁹⁵⁾. O mesmo padrão foi observado em murinos pós-infecção por *L. donovani* ⁽¹⁹⁶⁾. A linfopenia também foi observada em cães infectados por *L. infantum*, estando associada a um perfil imunossupressor ^(120,165).

Em contraponto, foi realizada uma análise semi-quantitativa de macrófagos e de linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺ e Treg) na parede intestinal, linfócitos não circulantes, de cães, estabelecendo uma comparação entre três grupos: cães com LVC (apresentando alta carga parasitária de amastigotas intestinais), um segundo grupo de cães com LVC que não

apresentavam amastigotas intestinais e cães não infectados. Após análise, foi então observado que havia um alto número de células T CD8⁺ e de macrófagos no intestino dos cães com LVC (presença de alta carga de amastigotas no intestino), quando em comparação com os outros dois grupos. Os autores observaram ainda que o número de células T CD4⁺ e Treg eram similares entre os três grupos ⁽¹⁹⁷⁾. Tais resultados sugerem migração de células T CD8⁺ para os sítios de infecção, o que deve diminuir a proporção dessas células em sangue periférico.

O mesmo padrão foi identificado em camundongos BALB/c quando infectados com *Leishmania major*, e ambos os trabalhos sugerem que a depleção de linfócitos TCD4⁺ impede o desenvolvimento da ação efetora das células TCD8⁺ mas que as células TCD4⁺ sozinhas também não são capazes de induzir a diminuição da carga parasitária. Por fim, foi sugerido que a interação entre as células TCD4⁺ e TCD8⁺ é importante para a ativação de toxicidade e que provavelmente esta ativação é dependente de IFN- γ ^(175,194). Os resultados de MFI, por sua vez, demonstraram uniformidade entre os grupos no que diz respeito à expressão de moléculas CD8 (Figura 14D). Essa molécula está relacionada à ativação de linfócitos, em conjunto com o TCR, e pelo resultado, sugere-se que a expressão dessa molécula não varia apesar da infecção e dos sinais clínicos.

A análise de morte celular de PBMCs, em abordagem *ex vivo*, pode evidenciar se há diferença na viabilidade destas células em cães com LVC, sintomáticos e assintomáticos, quando em comparação com cães saudáveis. Dessa forma, os grupos de estudo (NI, IAS e IS) foram avaliados quanto ao efeito da infecção na morte celular de PBMCs, observando se há modulação da mesma e as diferenças entre os grupos. Para tanto, a marcação de morte celular por apoptose inicial foi analisada pela marcação com Anexina V, identificando então as células Anexina V⁺ como aquelas que entraram a pouco no processo de apoptose. Nessa análise observou-se que houve uma diminuição significativa na porcentagem de células, que estão no processo de apoptose tardia, nos grupos IAS e IS quando em comparação com os NI (Figura 15A). Tal resultado sugere que a *Leishmania* está modulando o

processo de apoptose em PBMCs nos cães infectados pertencentes ao presente estudo.

O processo de inibição da apoptose já foi descrito para macrófagos e DCs caninos, de modo que o parasito é capaz de se multiplicar e manter a infecção, sendo essa uma das estratégias de evasão da *Leishmania* à imunidade ⁽⁷⁷⁾. Foi ainda observado em neutrófilos, no qual a *Leishmania* é capaz de sobreviver em compartimentos não líticos, escapando da ação oxidativa e podendo até modular a produção de NO, o que prolonga a vida dessas células para que possam infectar APCs pela estratégia de infecção silenciosa conhecida como “Cavalo de Tróia” ⁽⁷³⁾. Como a separação de PBMCs obtida no presente estudo apresenta as populações citadas acima, é possível que as mesmas modulações estejam acontecendo nas amostras dos cães infectados, participantes neste estudo.

A caracterização de morte celular por necrose foi realizada com iodeto de Propídeo (PI), de modo que a população PI⁺ deve estar em necrose. O resultado desta análise mostrou porcentagens inferiores a 1% para os três grupos (Figura 15B). O que sugere que poucas células morrem por necrose tanto em cães não infectados quanto em cães infectados.

Foi ainda observada uma tendência de aumento da porcentagem de PBMCs em processo de apoptose tardia, Anexina V⁺PI⁺, no grupo IAS quando em comparação com o grupo NI (Figura 15C). Resultados semelhantes foram encontrados em humanos de um estudo que descreveu maior taxa de morte por apoptose tardia de monócitos e linfócitos T em pacientes com LV aguda. Observaram ainda maior porcentagem de linfócitos T apoptóticos que monócitos, principalmente os linfócitos de perfil Th1, fato que pode ser responsável pela depressão imune característica de casos graves de LV ⁽¹¹⁰⁾.

A análise de morte celular não foi realizada em decorrência da perda de célula após cultura, provavelmente por conta da contaminação na separação de PBMCs e possivelmente por conta do kit e metodologia utilizada para marcação de morte celular.

A abordagem *in vitro* tinha o objetivo de identificar se as proteínas

recombinantes ADF/Cofilina e RAB1-GTPase eram imunogênicas de modo que pudessem ser consideradas candidatas para o desenvolvimento de um novo teste sorológico rápido, do tipo DPP, ou de uma nova vacina. O teste imunocromatográfico rápido (DPP) é um teste qualitativo que detecta anticorpos anti-*Leishmania* circulantes com a utilização dos antígenos recombinantes de *L. infantum*. Um grande número de proteínas recombinantes já foram identificadas como efetivas no diagnóstico de LVC, mas muitas delas ainda apresentam reações cruzadas com outras doenças parasitárias, como toxoplasmose, tuberculose, entre outros ⁽¹⁹⁸⁾. Dessa forma, é preciso encontrar opções de proteínas recombinantes candidatas que possam melhorar a sensibilidade e especificidade desses testes rápidos imunocromatográficos, motivo pelo qual foram testadas tais proteínas no presente estudo.

Inicialmente, foi observada a expressão da molécula CD44 em monócitos com o meio (controle negativo) e com a reestimulação com SLA e os antígenos recombinantes de *L. infantum* (ADF/Cofilina e RAB1-GTPase). Com base nos resultados, foi possível observar que o padrão de porcentagem de monócitos CD44⁺ dos grupos não variou muito após os tratamentos, quando em comparação com o controle negativo (Figura 16A). O grupo IAS apresentou uma tendência ao aumento na porcentagem de monócitos CD44⁺ que os demais, seguido pelos grupos IS com valores medianos e os grupos NI, que apresentaram as menores porcentagens. A análise de MFI sugeriu quantidades semelhantes dessa molécula nos grupos entre as diferentes condições, todos com baixa média de intensidade de fluorescência (Figura 17A). Tal resultado sugere que estas porcentagens de monócitos CD44⁺ bem como a expressão dessa molécula não variaram apesar dos tratamentos. A função da molécula CD44 ainda é pouco descrita para cães, no entanto, para humanos e camundongos, sua função está relacionada com a migração das células para os linfonodos e entrada de leucócitos nos sítios de infecção, por ser uma molécula de adesão ^(183–185). Tal resultado apresentou-se em divergência com o observado na análise *ex vivo*, mesmo no grupo controle sem estímulo, de modo que as condições da

cultura podem ter modificado a expressão dessa molécula em monócitos.

Para a identificação de monócitos, em abordagem *in vitro*, foi feita a marcação da molécula CD14 e observou-se que os grupos pertencentes às condições tratadas com as proteínas recombinantes (ADF/Cofilina e RAB1-GTPase) apresentaram porcentagem de monócitos CD14⁺ similar ao MEIO (controle negativo) (Figura 16B). No entanto, os grupos tratados com SLA apresentaram um aumento na porcentagem de células CD14⁺, principalmente dos grupos IS (67,95%) e IAS (55,80%) em relação ao NI (53,55%) (Figura 17B). Em um estudo, observou-se uma diminuição significativa da porcentagem de monócitos CD14⁺ caninos no grupo IS em comparação ao NI, o que contrasta com o resultado encontrado no presente trabalho ⁽⁶¹⁾.

Já na análise do MFI, os grupos tratados com as proteínas recombinantes apresentaram uma tendência de aumento na média de intensidade de fluorescência dessa molécula, enquanto que o grupo tratado com SLA apresentou uma tendência de diminuição do MFI (Figura 16B). Tais resultados sugerem que o tratamento com SLA apresentou uma tendência de aumento da porcentagem de monócitos CD14⁺, no entanto, a expressão dessas moléculas apresentou uma tendência de diminuição em relação aos demais grupos. É possível que o SLA tenha sido reconhecido e promovido a ativação e proliferação dessas células. Esse evento seria o oposto do que se observa em linfócitos humanos que, após o estímulo com SLA, não apresentam proliferação, sugerindo anergia dessas células em humanos com LV ⁽⁸⁷⁾.

Nos resultados relativos à população de monócitos CD14⁺MHC-II⁺, foi observado que mais de 78% dos monócitos CD14⁺ apresentaram a expressão de MHC-II, chegando a 97% no grupo ADF/Cofilina-IS (Figura 16C). Na análise de MFI, no entanto, observou-se uma tendência ao aumento na expressão de MHC-II nos grupos IAS que nos IS, sendo que IS manteve-se semelhante ao NI (Figura 17C). Este dado entra em concordância com o estudo de Reis e colaboradores, no qual eles descrevem maior expressão de moléculas MHC-II e em cães IAS que em

cães IS ⁽⁶¹⁾. Assim como o estudo de Viana, que identifica menor expressão de HLA-DR (MHC-II) em humanos nos monócitos infectados com *L. infantum* que com *L. braziliensis* (176). Nos resultados de MFI, por sua vez, as células CD14⁺MHC-II⁺ nos cães assintomáticos apresentaram valores muito variados, enquanto as do grupo IS apresentaram um perfil mais homogêneo. No entanto, os tratamentos pareceram não alterar a expressão de MHC-II.

Quanto à porcentagem de linfócito B, CD19⁺, o grupo IS apresentou uma tendência de aumento, quando em comparação com os outros dois grupos em todas as condições (Figura 18A). O mesmo foi observado na população de CD19⁺CD25⁺ (Figura 18B). Esse resultado contrasta com trabalhos que descrevem, como característica comum de cães infectados sintomáticos, o baixo nível de linfócitos B em sangue periférico, contanto com grandes quantidades de imunoglobulinas circulantes ^(61,166), anti-*Leishmania* e algumas autoimunes ⁽¹⁸⁹⁾. Entretanto, a resposta humoral não é efetiva no controle do parasito e é responsável pelos sinais clínicos observados, com alta deposição de imunocomplexos e dano tecidual por conta da resposta humoral autoimune ⁽¹⁸⁹⁾. No entanto, em camundongos foram ainda identificadas linfócitos B reguladores, com perfil CD1d^{high} CD5⁺ CD19^{high}, que são produtoras de IL-10, citocina com ação anti-inflamatória, sendo assim capazes de controlar a inflamação e autoimunidade, podendo contribuir com o perfil de suscetibilidade à LV ⁽¹⁹⁹⁾.

A co-cultura com linfócitos B de cães com LVC foram suficientes para suprimir a ação efetora de linfócitos do perfil Th1 ⁽²⁰⁰⁾. Dessa forma, os altos níveis de linfócitos B podem contar também com linfócitos B reguladores. A análise de MFI demonstrou expressão similar de CD19 entre os grupos (Figura 19A) assim como de CD25, entre as células CD19⁺ (Figura 19B). Sugerindo então que os tratamentos não modularam a expressão dessas moléculas de superfície.

Com relação à porcentagem de linfócitos CD4⁺CD25⁺, os grupos IAS e IS tratados apresentaram tendência de aumento na porcentagem dessas células, quando em comparação com o MEIO (Figura 18C). O grupo NI apresentou uma diminuição na porcentagem de células CD4⁺CD25⁺ após os

tratamentos (Figura 18C). No entanto a expressão da molécula CD25 em células CD4⁺ manteve-se baixa em todos os grupos e em todos os tratamentos (Figura 19C). As células Treg, CD4⁺CD25⁺ (em conjunto com outras moléculas marcadoras), podem estar relacionadas à progressão da doença por serem produtoras de citocinas IL-10 e TGF- β que participam na polarização da resposta imune pra Th2, que representa um perfil de susceptibilidade ⁽²⁰¹⁾.

Em humanos e murinos foi descrito que a liberação, por Treg, das citocinas citadas anteriormente também contribuem para a suscetibilidade e patogênese da doença nessas espécies ⁽¹⁹²⁾. Essas células são capazes, ainda, de suprimir a proliferação de células TCD4⁺, por serem parcialmente não responsivas ao estímulo via TCR e acabam por suprimir a proliferação de linfócitos TCD4⁺ na mesma cultura. Essa supressão é feita pelo contato entre células ao invés da ação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β ^(202,203). Há ainda indícios de que células CD4⁺CD25⁺ expressem TGF- β 1 na superfície celular, de modo que a função supressora acontece após o contato da célula TCD4⁺ com o TGF- β 1 na superfície celular ⁽²⁰⁴⁾. Essas células podem estar compondo a porcentagem de linfócitos T observados neste estudo.

Com relação à distribuição linfócitos TCD4⁺ por grupo e por tratamento, foi possível observar que a porcentagem de linfócitos TCD4⁺ nos grupos IS em todas as condições apresentou tendência ao aumento, seguido pelos grupos IAS, quando em comparação com o grupo NI (Figura 20A). Esse resultado difere em relação ao observado em outros estudos, nos quais em geral, cães sintomáticos apresentam menor porcentagem de linfócitos TCD4⁺ quando em comparação com os assintomáticos e não infectados ^(120,165). Entretanto, alguns pesquisadores não observaram redução da população TCD4⁺ apesar das diferentes formas clínicas de LVC, quando em comparação com os não infectados ^(205,206). Já o MFI demonstrou uma tendência de aumento para os grupos IAS e de diminuição para os grupos IS, quando em comparação ao grupo NI. Ainda, os grupos tratados com ADF/Cofilina, RAB1-GTPase e LPS pareceram demonstrar uma

tendência de aumento em relação as duas outras condições (Figura 21A). No entanto, as porcentagens (Figura 20A) não variaram significativamente entre os tratamentos, assim como o MFI (Figura 21A) de modo que as proteínas recombinantes, assim como o SLA, não parecem modular essas células.

Já os linfócitos TCD8⁺ apresentaram tendência ao aumento da porcentagem desta célula no grupo IS que nos outros dois grupos e não variou significativamente entre as condições (Figura 20B), assim como foi observado nos linfócitos TCD4⁺ (Figura 20A). Esse resultado difere do que foi observado em outros estudos nos quais identificaram menor porcentagem de células TCD8⁺ em sangue periférico de cães IS que em cães IAS ⁽⁸⁷⁾. Ainda, na análise de MFI, os grupos tratados com ADF/Cofilina, RAB1-GTPase e LPS pareceram demonstrar uma tendência de aumento do MFI em relação as duas outras condições (Figura 21B). Esses dados indicam a necessidade de aumentar a amostragem para identificar a intensidade de modulação da imunidade celular causada por essas proteínas em abordagem *in vitro*.

Os resultados observados, tanto para T CD4⁺ quanto para T CD8⁺, contrasta com o que foi descrito no estudo de Pinelli e colaboradores, que demonstrou maior proliferação de linfócitos, após estímulo com SLA, em cães IAS e menor em cães IS, para ambos os grupos: cães infectados naturalmente (de raças variadas) e cães infectados experimentalmente. Dessa forma, Pinelli descreveu uma fraca proliferação de linfócitos de cães infectados sintomáticos quando foram estimulados com SLA, e observou ainda que essa anergia é antígeno específica. Para isso, os linfócitos de cães com LVC foram estimulados com Dohyvax, uma vacina utilizada como controle positivo, que foi capaz de causar a proliferação de linfócitos dos cães dos grupos citados acima, evidenciando a especificidade da anergia ao SLA ⁽¹⁶⁶⁾.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que as proteínas recombinantes utilizadas (ADF/Cofilina e RAB1-GTPase) não foram capazes de modular de forma significativa as populações de monócitos e linfócitos e a

expressão das moléculas analisadas no estudo sob as metodologias utilizadas neste trabalho. No entanto, os resultados da Figura 19 indicam uma necessidade de desenvolvimento de estudos complementares para identificação do impacto dessas proteínas em cultura. A análise *in vitro* ainda apresentou algumas limitações com relação à falta de pureza na separação pelo método utilizado no estudo (Figura 8).

Na análise por citometria feita neste estudo, foi possível identificar uma população densa, com granulosidade similar à população de monócitos e tamanho, em geral, um pouco menor que esta (Figuras 9 e 10). Tal população apresentou alta marcação de moléculas CD4, o que condiz com o que Moore e colaboradores observaram, que os neutrófilos do sangue periférico de cães apresentam uma abundância de moléculas CD4, característica específica da espécie ⁽²⁰⁷⁾. De acordo com Rzepecka e colaboradores, a identificação de monócitos em cães, por citometria, pode ser comprometida pela contaminação, por neutrófilos, da região referente à população de monócitos no parâmetro granulosidade (SSC), de modo que a identificação deve ser feita com anticorpos específicos para cada população ⁽¹⁰³⁾. Esses achados corroboram o que se observou em microscopia (Figura 8), sugerindo que o protocolo de separação utilizado neste estudo, e amplamente utilizado em outros trabalhos, não é eficiente no que diz respeito à separação das populações de leucócitos caninos com alta pureza de mononucleares. Uma limitação do presente trabalho está no fato de não ter tido acesso a um marcador específico de neutrófilo para identificação dessa população.

A contaminação da população de células mononucleares por neutrófilos apresentou um impacto importante na cultura para a realização das análises *in vitro*. Foi observada a perda da população que sugere-se que compreenda à população de neutrófilos, como citado anteriormente, após a cultura em análise *in vitro*, em todas as condições, o que indica a morte dessas células (Figura 11). Segundo Almeida e colaboradores, a *Leishmania* causa alterações no metabolismo oxidativo de neutrófilos caninos, a depender do estágio da doença, e ainda podem apresentar

resistência aos compostos oxidativos (ROS e NO). Quando a produção de ROS excede a capacidade antioxidante da célula, isso pode causar o início do processo de apoptose da mesma, comprometendo sua viabilidade e função, permitindo a persistência da infecção. Cães em estágio inicial da doença apresentam ainda o metabolismo oxidativo ativo, sem comprometimento da viabilidade dos neutrófilos. No entanto, quando em estágios mais avançados, os neutrófilos apresentam uma diminuição do metabolismo oxidativo e um aumento na taxa de apoptose dessas células e multiplicação dos parasitos ⁽¹⁴⁶⁾. Dessa forma, a alta taxa de apoptose em neutrófilos caninos pós-infecção deve impactar negativamente a cultura *In vitro*.

De acordo com Bruin e colaboradores, um pré-requisito para o desenvolvimento de uma análise *In vitro* adequada é obter populações relativamente puras de PBMCs do sangue periférico total ⁽¹⁸¹⁾. Em culturas de PBMCs de ruminantes, observou-se que a contaminação por PMNs afetou o resultado da análise de proliferação de linfócitos, inibindo-a e causando variações de acordo com o grau de contaminação das amostras ⁽²⁰⁸⁾. Em humanos, já é bem descrito que neutrófilos interagem, em contato direto com as células ou por secreção de produtos, com DCs, macrófagos, monócitos e linfócitos T e B, podendo direcionar respostas inflamatórias no meio, quando em cultura, e nos tecidos ⁽²⁰⁹⁾. Eles ainda apresentam um curto período de vida e continuamente morrem por apoptose, ainda que não estejam infectados ⁽²¹⁰⁾.

Neutrófilos apoptóticos são removidos por macrófagos, que após a fagocitose, produzem mediadores antiinflamatórios, como TGF- β , que polarizam a resposta para o perfil Th2 ^(211,212). Em contrapartida, neutrófilos em necrose induzem a ativação do metabolismo oxidativo de macrófagos, com a liberação de mediadores pró inflamatórios, como TNF- α ⁽²¹³⁾. Um estudo de Leal e colaboradores identificou que neutrófilos de cães infectados por *L. infantum*, quando estimulados com SLA, apresentaram maior síntese de IFN- γ , uma citocina pró inflamatória ⁽⁷⁸⁾ que polariza a resposta imune para o perfil Th1. Tais estudos evidenciam a necessidade de obter

populações puras para que seja possível observar a ação real do tratamento aplicado a cada condição de uma análise *In vitro*, sem a influência da interação e dos produtos sintetizados por neutrófilos na cultura. Dessa forma, a presença de neutrófilos na cultura pode ter modulado o número de células e a expressão de moléculas de superfície de linfócitos e monócitos e influenciando no resultado encontrado nos testes *in vitro*.

Portanto, neste estudo, buscou-se a padronização de um novo protocolo de separação por gradiente descontínuo, utilizando o Percoll em duas fases com concentrações diferentes, no intuito de propor uma nova metodologia que seja eficiente e simplificada, processo esse que continua em andamento.

7. CONCLUSÃO

Os dados sugerem que é possível que a *Leishmania* seja capaz de modular a morte celular, se utilizando provavelmente essa estratégia com mecanismo de escape da resposta imune na LVC. A menor expressão da molécula CD44 em cães IS, com relação ao controle NI, pode indicar menor capacidade de apresentação de antígenos em monócitos desse grupo de cães. Ainda, a maior expressão de CD4 em linfócitos de cães IS em relação aos cães IAS é um resultado que deve ser melhor estudado para compreensão de seu impacto na resposta imune celular dos indivíduos IS.

Os resultados encontrados sugerem que o tratamento com proteínas recombinantes não apresentou modulação significativa das populações de monócitos, linfócitos e das moléculas de superfície analisadas no estudo, sob as metodologias utilizadas neste trabalho. No entanto, alguns resultados sugerem que sejam realizados estudos complementares, com aumento da amostragem, a fim de identificar o potencial imunogênico e verificar se há possibilidade utilização dessas em métodos diagnósticos.

Alguns biomarcadores baseados na expressão de moléculas e porcentagem de monócitos e linfócitos, descritos nesse estudo, podem ser utilizados para identificar o perfil de susceptibilidade ou resistência do hospedeiro. Esses dados podem ser úteis para futuros estudos relacionados a tratamento, diagnóstico e imunoprofilaxia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Galvis-ovallos F, Casanova C, Bergamaschi DP, Galati AB. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. 2018;12(14):e0006333.
2. Molyneux DH, Savioli L, Engels D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *Lancet* [Internet]. 2017;389(10066):312–25. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30171-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30171-4)
3. WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organ. 2010;1–184.
4. Kamhawi S. The yin and yang of leishmaniasis control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4):1–6.
5. WHO. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Cholera. 2015.
6. Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *Lancet* [Internet]. 2009;373(9674):1570–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60233-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60233-6)
7. Liese BH, Houghton N, Teplitskaya L. Development assistance for neglected tropical diseases: Progress since 2009. *Int Health*. 2014;6(3):162–71.
8. WHO. World Health Assembly resolution WHA66.12: Neglected tropical diseases: prevention, control, elimination and eradication. 2013;2012(March 2013):1–8. Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA66/A66_20-en.pdf?ua=1
9. WHO. NTD RoadMap WHO. 2012; Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf

10. Kharas, Homi. Gerlach, Karina. Elgin-Cossart M. ECONOMIES THROUGH SUSTAINABLE DEVELOPMENT A NEW GLOBAL PARTNERSHIP: The Report of the High-Level Panel of Eminent Persons on-2nd part. 2013;81.
11. Meeting TB. Global Fund support for co- infections and co-morbidities.
12. WHO | Leishmaniasis [Internet]. [cited 2020 Jan 4]. Available from: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
13. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):1–40.
14. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2012;26(2):309–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>
15. Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for canine leishmaniasis. *Front Immunol*. 2012;3(APR).
16. Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad Saude Publica*. 2010;26(4):644–5.
17. OPS/OMS OP de la S. Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas. *Inf Leishmaniasis*. 2016;4:3–7.
18. WHO. Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Heal Organ Geneva*. 2017;92(38):557–72.
19. Lara-Silva F de O, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza V de OP, Pessanha JEM, Regina-Silva S, et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop*. 2015;148:128–36.
20. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites and Vectors*. 2009;2(SUPPL.1):1–8.
21. Oddone CR. Leishmaniosis visceral: a 101 años del primer caso diagnosticado en las Américas Visceral leishmaniosis: 101 years from

- the first case diagnosed in the Americas. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2012;10(1):100–4.
22. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2004;7(3):338–49. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&lng=pt&tlng=pt
23. Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2008;24(12):2959–63. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2008001200027&lng=en&tlng=en
24. Conti RV, Lane VFM, Montebello L, Pinto Junior VL. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *J Vector Borne Dis*. 2016;53(2):99–104.
25. Ministério da Saúde. DATASUS (Internet). DATASUS: LEISHMANIOSE VISCERAL - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil. 2017. [Internet]. [cited 2018 Apr 25]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>
26. Carranza-Tamayo CO, Carvalho M do SL de, Bredt A, Bofil MIR, Rodrigues RMB, Silva AD da, et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasília, Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2010;43(4):396–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822010000400012&lng=en&tlng=en
27. Ministério da Saúde. DATASUS (Internet). DATASUS: LEISHMANIOSE VISCERAL - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Distrito Federal. 2017. [Internet]. [cited 2018 Apr 25]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvdf.def>

28. Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018;2018(CI):1–12. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3296893/>
29. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol* [Internet]. 2012;28(12):531–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007>
30. Brasil M da S. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2014. 120 p. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
31. Cameron MM, Acosta-Serrano A, Bern C, Boelaert M, Den Boer M, Burza S, et al. Understanding the transmission dynamics of *Leishmania donovani* to provide robust evidence for interventions to eliminate visceral leishmaniasis in Bihar, India the LCNTDR Collection: Advances in scientific research for NTD control. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1309-8>
32. Al-Salem W, Herricks JR, Hotez PJ. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1743-7>
33. Du R, Hotez PJ, Al-Salem WS, Acosta-Serrano A. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):1–11.
34. Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7):1013–8.

35. Fischer D, Thomas SM, Beierkuhnlein C. Modelling climatic suitability and dispersal for disease vectors: The example of a phlebotomine sandfly in Europe. *Procedia Environ Sci.* 2011;7:164–9.
36. Obwaller AG, Karakus M, Poepl W, Töz S, Özbel Y, Aspöck H, et al. Could *Phlebotomus mascittii* play a role as a natural vector for *Leishmania infantum*? New data. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1750-8>
37. Carvalho BM, Rangel EF, Ready PD, Vale MM. Ecological niche modelling predicts southward expansion of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vector of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in South America, under climate change. *PLoS One.* 2015;10(11):1–21.
38. Sevá A da P, Mao L, Galvis-Ovallos F, Tucker Lima JM, Valle D. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(2):1–17.
39. WHO | One Health [Internet]. [cited 2020 Jan 6]. Available from: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>
40. Gibbs EPJ. The evolution of one health: A decade of progress and challenges for the future. *Vet Rec.* 2014;174(4):85–91.
41. Ryu S, Kim BI, Lim JS, Tan CS, Chun BC. One health perspectives on emerging public health threats. *J Prev Med Public Heal.* 2017;50(6):411–4.
42. Parent A. Félix Vicq d’Azyr: Anatomy, medicine and revolution. *Can J Neurol Sci.* 2007;34(1):30–7.
43. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2001;356(1411):983–9.
44. GHARBI M, MHADHBI M, REJEB A, JAOUADI K, ROUATBI M, DARGHOUTH MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Rev Sci Tech l’OIE* [Internet]. 2015;34(2):613–26. Available from: <http://doc.oie.int:8080/dyn/portal/index.seam?page=alo&alold=33005>

45. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2009;165(1–2):1–18.
46. Soccol VT, Pasquali AKS, Pozzolo EM, De Souza Leandro A, Chiyo L, Baggio RA, et al. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. *PLoS One.* 2017;12(12):1–18.
47. Riboldi E, Carvalho F, Romão PRT, Barcellos RB, Bello GL, Ramos RR, et al. Molecular method confirms canine leishmania infection detected by serological methods in non-endemic area of Brazil. *Korean J Parasitol.* 2018;56(1):11–9.
48. Faria S, Marques F, Jesus AK De, Sousa FA De. *Epidemiológico.* 2017;18(Lv).
49. Mota Herenio E, Fortes RC, Rincon G. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. *J Heal Sci Inst.* 2014;32(2):126–9.
50. Ribeiro CR, Gonçalves CA, Cruz LM, Galera PD. Prevalence of visceral canine leishmaniosis and co-infections in periurban region in the Federal district - Brazil. *Cienc Anim Bras.* 2019;20:1–8.
51. Duarte MC, Lage DP, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Menezes-Souza D, et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(4):398–407.
52. Solano-gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. *Trends Parasitol [Internet].* 2017;xx:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.06.004>
53. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum comparée.* 1993;68(2):107–8.
54. Poinar G, Poinar R. Fossil evidence of insect pathogens. *J Invertebr Pathol.* 2005;89(3):243–50.

55. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013;27(2):123–47.
56. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 1999;119(3):237–46.
57. Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Filho JG, Perri SH V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol.* 2010;170(1–2):131–3.
58. Lainson R, Rangel BF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(8):811–27.
59. Andrade Filho JD, Brazil RP. Relationships of New World Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) Based on Fossil Evidence. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(SUPPL. 1):145–9.
60. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009;136(14):1915–34.
61. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128(1–3):87–95.
62. Alves GBB, Silva L dos S, Batista JF, Campos ÂP, Prianti M das G, Costa FAL. Soro-conversão e avaliação das alterações renais em cães infectados por *Leishmania (Infantum) chagasi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013;55(2):105–12.
63. CABRAL M, O'GRADY J, ALEXANDER J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* 1992;14(5):531–9.
64. Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMDS, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(7):831–46.

65. Palatnik-De-Sousa CB, Dos Santos WR, França-Silva JC, Da Costa RT, Barbosa Reis A, Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(5):510–7.
66. Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, da Silva ES, et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4).
67. Alterações EDE, Em F, Paula a N a, Marciano V. Mestrado em Ciências da Saúde CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA NA. *Biologia (Bratisl).* 2006;
68. Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: Epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol.* 2009;20(5–6):471–89.
69. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, et al. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 2002;169(2):898–905.
70. Gueirard P, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol.* 2008;10(1):100–11.
71. Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, da Silva AC. Deception and manipulation: The arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front Immunol.* 2014;5(OCT):1–16.
72. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-de-Souza MCA, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. *J Immunol.* 2004;172(7):4454–62.
73. Pereira MA, Alexandre-Pires G, Câmara M, Santos M, Martins C, Rodrigues A, et al. Canine neutrophils cooperate with macrophages in the early stages of *Leishmania infantum* in vitro infection. *Parasite*

- Immunol. 2019;41(4):1–13.
74. Diaz S, da Fonseca IP, Rodrigues A, Martins C, Cartaxeiro C, Silva MJ, et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. *Vet Parasitol.* 2012;189(2–4):137–44.
 75. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002;18(9):399–405.
 76. Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis LES, et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8).
 77. Teixeira MCA, de Sá Oliveira GG, Santos POM, Bahiense TC, da Silva VMG, Rodrigues MS, et al. An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to *Leishmania* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(2):182–9.
 78. de Almeida Leal GG, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Carneiro CM, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol [Internet].* 2014;205(3–4):472–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.022>
 79. Pedraza-Zamora CP, Delgado-Domínguez J, Zamora-Chimal J, Becker I. Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity. *Parasite Immunol.* 2017;39(4):1–13.
 80. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27(1):485–517.
 81. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine.* 2008;43(3):402–7.
 82. da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Marques Michalick MS, Alexander B, Williams P, et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Vet J.* 2007;174(3):636–43.

83. Nicolato RDC, De Abreu RT, Roatt BM, Aguiar-Soares RDDO, Reis LES, Carvalho MDG, et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One*. 2013;8(12).
84. Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*. 1992;45(1–2):33–47.
85. Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*. 2008;84(2):269–77.
86. Gonçalves AAM, Leite JC, Resende LA, Mariano RM da S, Silveira P, Melo-Júnior OA de O, et al. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9(December).
87. Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1985;76(6):2066–9.
88. Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: Reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun*. 1981;33(2):498–502.
89. Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest*. 1989;83(3):860–4.
90. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, et al. Balance of IL-10 and interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis*. 2005;5:1–9.
91. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449(7161):419–26.

92. Keppel KE, Campbell KL, Zuckermann FA, Greeley EA, Schaeffer DJ, Husmann RJ. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;123(3–4):337–44.
93. Taszkun I. Expression of CD3, CD4, CD8, CD21, and MHC II lymphocyte antigens and serum IL-10 concentration in dogs with atopic dermatitis complicated by purulent dermatitis. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2013;57(3):365–70.
94. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. the B7 Family Revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23(1):515–48.
95. Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negron E, Convit J, Tapia FJ. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: Analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(6):618–24.
96. Bismarck D, Schütze N, Moore P, Büttner M, Alber G, Buttler H v. Canine CD4+CD8+ double positive T cells in peripheral blood have features of activated T cells. *Vet Immunol Immunopathol [Internet].* 2012;149(3–4):157–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.06.014>
97. Alldinger S, Baumgärtner W, Kremmer E, Fonfara S. Characterization of a Canine CD44 Specific Monoclonal Antibody. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med.* 1999;46(1):19–32.
98. Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity.* 1997;6(2):107–18.
99. Faldyna M, Levá L, Knötigová P, Toman M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - A flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;82(1–2):23–37.
100. Riondato F, Martini V, Poggi A, Rota A, Comazzi S, Sulce M, et al. Identification of a suitable internal control for fluorescence analysis on

- canine peripheral blood samples. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2016;172:38–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.03.007>
101. De Carvalho CM, Bonnefont-Rebeix C, Picandet S, Bernaud J, Phothirath P, Chabanne L, et al. Evaluation of elutriation and magnetic microbead purification of canine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;101(3–4):171–8.
 102. Gibbons N, Goulart MR, Chang YM, Efstathiou K, Purcell R, Wu Y, et al. Phenotypic heterogeneity of peripheral monocytes in healthy dogs. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2017;190(November 2016):26–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.06.007>
 103. Rzepecka A, Żmigrodzka M, Witkowska-Piłaszewicz O, Cywińska A, Winnicka A. CD4 and MHCII phenotypic variability of peripheral blood monocytes in dogs. *PLoS One*. 2019;14(7):1–15.
 104. Oliveira Silva KL, Marin Chiku V, Luvizotto Venturin G, Correa Leal AA, de Almeida BF, De Rezende Eugenio F, et al. PD-1 and PD-L1 regulate cellular immunity in canine visceral leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2019;62(October 2018):76–87. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.002>
 105. Chiku VM, Silva KLO, de Almeida BFM, Venturin GL, Leal AAC, de Martini CC, et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. *Immunobiology*. 2016;221(8):879–88.
 106. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(11):953–7.
 107. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1458–61.
 108. Falcão S de AC, Jaramillo TMG, Ferreira LG, Bernardes DM, Santana JM, Favali CBF. *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system. *Front Immunol*. 2016;7(AUG):1–10.
 109. Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, Mitolo V, et al.

- Infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52(3):211–7.
110. Potestio M, Agostino PD, Romano GC, Milano S, Ferlazzo V, Aquino A, et al. CD4+ CCR5+ and CD4+ CCR3+ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in Patients With Acute Visceral Leishmaniasis. *Immunology.* 2004;113(2):260–8.
 111. Elmahallawy EK, Sampedro Martínez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(8):961–72.
 112. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008;158(4):274–87.
 113. OMS. WHO: Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Heal Organ Geneva.* 2017;92(38):557–72.
 114. Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, et al. rKLO8, a Novel *Leishmania donovani* - Derived Recombinant Immunodominant Protein for Sensitive Detection of Visceral Leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7).
 115. Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Testasica MCS, Lage DP, Costa LE, Lage PS, et al. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins identified by an immunoproteomic approach. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(6):931–44.
 116. Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Costa LE, Garde E, Dimer LM, et al. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2016;115(4):1649–58.
 117. Menezes-Souza D, Mendes TA de O, Gomes M de S, Bartholomeu DC, Fujiwara RT. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell

- Epitope. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(1):1–12.
118. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57(04):1–88.
 119. Faria AR, Andrade HM de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2012;3(2):47–57.
 120. Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagnostic Investig*. 1997;9(4):439–40.
 121. Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet J*. 2008;175(1):45–52.
 122. Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs . *J Infect Dis*. 2004;189(9):1729–33.
 123. Ferreira S de A, Ituassu LT, Melo MN de, Andrade ASR de. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2008;152(3–4):257–63.
 124. Schwartz E, Hatz C, Blum J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(6):342–9.
 125. Coutinho CER, Santos DO, Baptista C, Figueiredo FB, de Fatima Madeira M. Avaliação de amostras de leishmania (*leishmania*) chagasi isoladas de cães oriundos de duas áreas endêmicas de leishmaniose visceral no Brasil através da eletroforese de isoenzimas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(5):572–5.
 126. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1990;71(3):267–75.
 127. Andresen K, Gasim S, Elhassan AM, Khalil EAG, Barker DC, Theander

- TG, et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. *Trop Med Int Heal*. 1997;2(5):440–4.
128. Parasitol A, Comp H. F Leishmania . Use O F Isoenzym Es . Suggestions Fo R a New Classification. 1990;111–25.
 129. Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(1).
 130. Khanra S, Datta S, Mondal D, Saha P, Bandopadhyay SK, Roy S, et al. RFLPs of ITS, ITS1 and hsp70 amplicons and sequencing of ITS1 of recent clinical isolates of Kala-azar from India and Bangladesh confirms the association of *L. tropica* with the disease. *Acta Trop* [Internet]. 2012;124(3):229–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.017>
 131. Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):459–67.
 132. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Notomi et al LAMP.pdf. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000;28(12):e63. Available from: https://watermark.silverchair.com/2800e63.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAmYwggJiBqkqhkiG9w0BBwagggJTMIICTwIBADCCAKgGCSqGSIb3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMy3AQPdcwVpshAVuIAgEQgIICGSfU5ehJRqbly2A_4pd12_oNbrQem7FM_kTE9ZYQL40XC4I
 133. Deng P, Zhao SP, Dai HY, Guan XS, Huang HG. Atorvastatin reduces the expression of COX-2 mRNA in peripheral blood monocytes from patients with acute myocardial infarction and modulates the early inflammatory response. *Clin Chem*. 2006;52(2):300–3.
 134. Abbasi I, Kirstein OD, Hailu A, Warburg A. Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of

- Leishmania DNA in human blood samples. *Acta Trop* [Internet]. 2016;162:20–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.009>
135. Khan MGM, Bhaskar KRH, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of Leishmania DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasites and Vectors*. 2012;5(1):1–8.
 136. Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Ekram ARMS, Hashighuchi Y, et al. Sensitive, specific, and rapid detection of Leishmania donovani DNA by loop-mediated isothermal amplification. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81(4):578–82.
 137. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nat Rev Immunol*. 1991;350:91–2.
 138. Fraga DBM, Pacheco LV, Borja LS, Tuy PG da SE, Bastos LA, Solcà M da S, et al. The Rapid Test Based on Leishmania infantum Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):1–11.
 139. Ibrahim F, Thio THG, Faisal T, Neuman M. The application of biomedical engineering techniques to the diagnosis and management of tropical diseases: A review. *Sensors (Switzerland)*. 2015;15(3):6947–95.
 140. Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2010;63(2):309–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2009.06.088>
 141. Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA, et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9).
 142. Figueiredo FB, Vasconcelos TCB de, Madeira M de F, Menezes RC, Maia-Elkhoury ANS, Marcelino AP, et al. Validation of the Dual-path

- Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(11):e180260.
143. Costa LE, Lima MIS, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Martins VT, Duarte MC, et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic leishmania infantum antigens with potential serodiagnosis applications. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(1):96–106.
 144. Maia Z, Lírio M, Mistro S, Mendes CMC, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(1).
 145. Pereira L, Abbehussen M, Teixeira C, Cunha J, Nascimento IP, Fukutani K, et al. Vaccination with Leishmania infantum Acidic Ribosomal P0 but Not with Nucleosomal Histones Proteins Controls Leishmania infantum Infection in Hamsters. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):1–17.
 146. Martínez Abad LP, Almeida CS, Mattos AMM, Mendonça ACP, Alves MJM, Pinheiro AC, et al. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. *Acta Trop* [Internet]. 2017;166:133–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.021>
 147. Qualmann B, Kessels MM. New players in actin polymerization - WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol*. 2009;19(6):276–85.
 148. Kunda P, Baum B. The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol*. 2009;19(4):174–9.
 149. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, Ampe C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol*. 2008;87(8–9):649–67.
 150. Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, et al. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament

- turnover: Implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 1997;136(6):1307–22.
151. Tammana TVS, Sahasrabuddhe AA, Mitra K, Bajpai VK, Gupta CM. Actin-depolymerizing factor, ADF/cofilin, is essentially required in assembly of *Leishmania flagellum*. *Mol Microbiol.* 2008;70(4):837–52.
 152. Ralston KS, Hill KL. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: New tricks from an old dog. *Int J Parasitol.* 2008;38(8–9):869–84.
 153. Bahl S, Parashar S, Malhotra H, Raje M, Mukhopadhyay A. Functional characterization of monomeric GTPase Rab1 in the secretory pathway of *Leishmania*. *J Biol Chem.* 2015;290(50):29993–30005.
 154. Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016;227:98–114.
 155. Silva RA e, Andrade AJ de, Quint BB, Raffoul GES, Werneck GL, Rangel EF, et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2018;113(5):1–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000500303&lng=en&tlng=en
 156. Nardi ACF, Malta DC, Souza M de FM de, Duarte E, Ferreira HL, Duarte EC, et al. Resenha do livro Saúde Brasil 2014: uma análise da situação de saúde e das causas externas. Vol. 24, *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 2015. 803–804 p.
 157. Proposta prevê tratamento como alternativa à eutanásia de cães com leishmaniose - Notícias - Portal da Câmara dos Deputados [Internet]. [cited 2020 Jan 21]. Available from: <https://www.camara.leg.br/noticias/556503-proposta-preve-tratamento-como-alternativa-a-eutanasia-de-caes-com-leishmaniose/>
 158. Araújo MSS. Alterações imunológicas no sangue periférico de cães submetidos à imunoprofilaxia para leishmaniose visceral canina. *Belo Horiz Inst Ciências Biológicas.* 2006;187. 159. von Zuben APB,

- Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. *Cad Saude Publica*. 2016;32(6):1–11.
160. Yasur-Landau D, Jaffe CL, David L, Baneth G. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):1–13.
161. Szargiki R. Comparação de métodos diagnósticos em leishmaniose tegumentar americana. Diss Mestr em Parasitol. 2005;
162. Santos GLS. Identificação e Caracterização de Novos Antígenos Para o Diagnóstico Sorológico da Leishmaniose Visceral Canina. Universidade de Brasilia. 2017.
163. Trajano-Silva LAM. Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2017.
164. Peng L, Jiang H, Bradley C. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on lymphoma cells undergoing apoptosis. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2001;32(4):1415–20.
165. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*. 2006;81(1):68–75.
166. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*. 1994;62(1):229–35.
167. De Freitas JCC, Nunes-Pinheiro DCS. Leishmanioses: Uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. *Acta Vet Bras*. 2013;7(3):193–204.
168. Costa-Pereira C, Moreira ML, Soares RP, Marteleto BH, Ribeiro VM, França-Dias MH, et al. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis.

- BMC Vet Res [Internet]. 2015;11(1):1–10. Available from: ???
169. Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1553-y>
 170. Schaut RG, Grinnage-Pulley TL, Esch KJ, Toepp AJ, Duthie MS, Howard RF, et al. Recovery of antigen-specific T cell responses from dogs infected with *Leishmania (L.) infantum* by use of vaccine associated TLR-agonist adjuvant. *Vaccine* [Internet]. 2016;34(44):5225–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.016>
 171. Hosein S, Blake DP, Solano-Gallego L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*. 2017;144(1):95–115.
 172. Mota Herenio E, Fortes RC, Rincon G. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. *J Heal Sci Inst* [Internet]. 2014 [cited 2018 Apr 16];32(2):126–9. Available from: https://www.unip.br/presencial/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2014/02_abr-jun/V32_n2_2014_p126a129.pdf
 173. Carvalho, M. S. L. C, Bredt A, Roberta E, Meneghin, De Oliveira C. Phlebotominae Fauna (Diptera: Psychodidae) in Areas of Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis in the Federal District, Brazil, from 2006 to 2008 Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no. *Epidemiol Serv Saúde* [Internet]. 2010;19(3):227–37. Available from: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v19n3/v19n3a05.pdf>
 174. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):560–3.
 175. Herath S, Kropf P, Müller I. Cross-talk between CD8+ and CD4+ T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8+ T cells are

- required for optimal IFN- γ production by CD4⁺ T cells. *Parasite Immunol.* 2003;25(11–12):559–67.
176. Viana AG, Magalhães LMD, Giunchetti RC, Dutra WO, Gollob KJ. Infection of human monocytes with *Leishmania infantum* strains induces a downmodulated response when compared with infection with *Leishmania braziliensis*. *Front Immunol.* 2018;8(DEC):1–12.
 177. Buurman WA, Vegt PA, Groenewegen G, Linden CJ v d, Jeunhomme GMAA. Analysis of buoyant density of canine peripheral blood leukocytes with PVP-Silica (Percoll) density gradients. *Vet Immunol Immunopathol.* 1982;3(6):547–56.
 178. Kristensen F, Kristensen B, Lazary S. The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. 1982;3:203–77.
 179. Catchpole B, Hamblin AS, Staines NA. T cell lines generated with type II collagen proliferate in an autologous mixed lymphocyte response. *J Autoimmun.* 2001;17(3):181–9.
 180. Verfaillie T, Cox E, To LT, Vanrompay D, Bouchaut H, Buys N, et al. Comparative analysis of porcine cytokine production by mRNA and protein detection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;81(1–2):97–112.
 181. De Bruin T, De Rooster H, Van Bree H, Cox E. The effect of different isolation procedures on canine leucocyte populations and on lectin-induced lymphocyte proliferation. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med.* 2005;52(9):460–5.
 182. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *J Clin Pathol - Mol Pathol.* 1999;52(4):189–96.
 183. Weiss JM, Renkl AC, Sleeman J, Dittmar H, Termeer CC, Taxis S, et al. CD44 Variant Isoforms are Essential for the Function of Epidermal Langerhans Cells and Dendritic Cells. *Cell Commun Adhes.* 1998;6(2–3):157–60.
 184. Estess P, DeGrendele HC, Pascual V, Siegelman MH. Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity. *J Clin Invest.* 1998;102(6):1173–82.
 185. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH. Requirement for CD44 in

- activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* (80-). 1997;278(5338):672–5.
186. Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, Aguiar-Soares RD de O, et al. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*. 2008;26(5):623–38.
 187. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2006;28(7):329–37.
 188. Gradoni L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Vet Parasitol* [Internet]. 2015;208(1–2):94–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.003>
 189. Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol*. 2014;51(2):527–38.
 190. Pateraki E, Portocala R, Labrousse H, Guesdon JL. Antiactin and antitubulin antibodies in canine visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 1983;42(2):496–500.
 191. Smith BE, Tompkins MB, Breitschwerdt EB. Antinuclear Antibodies Can Be Detected in Dog Sera Reactive to *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *Ehrlichia canis*, or *Leishmania infantum* Antigens. *J Vet Intern Med*. 2004;18(1):47–51.
 192. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, et al. TGF- β 1 Plays an Important Role in the Mechanism of CD4 + CD25 + Regulatory T Cell Activity in Both Humans and Mice . *J Immunol*. 2004;172(2):834–42.
 193. Maciel BLL, Valverde JG, Rodrigues-Neto JF, Freire-Neto F, Keesen TSL, Jeronimo SMB. Dual Immune modulatory effect of vitamin a in human visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2014;9(9).
 194. Müller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J, Milon G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. *Int Immunol*. 1991;3(6):587–97.

195. Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2014;209(2):290–9.
196. Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stäger S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8+ T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog.* 2009;5(5).
197. Silva DT da, Alves ML, Spada JCP, Silva AC da, Silveira R de CV da, Oliveira TMF de S, et al. T lymphocytes and macrophages in the intestinal tissues of dogs infected with *Leishmania infantum*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2017;26(2):159–70.
198. Farahmand M, Nahrevanian H. Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. *Iran Biomed J.* 2016;20(3):128–34.
199. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011;117(2):530–41.
200. Schaut RG, Lamb MI, Toepp AJ, Scott B, Mendes- Aguiar, C.O. Coutinho JF., Jeronimo JMB, et al. Regulatory IgDhi B Cells Suppress T cell Function via IL-10 and PD-L1 During Progressive Visceral Leishmaniasis. *J Immunol Res.* 2016;196(10):4100–9.
201. Khadem F, Uzonna JE. Immunity to visceral leishmaniasis: Implications for immunotherapy. *Future Microbiol.* 2014;9(7):901–15.
202. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: Induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998;10(12):1969–80.
203. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Exp.* 1998;188(2):287–96.

204. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J Exp Med*. 2001;194(5):629–44.
205. Alexandre-Pires G, de Brito MTV, Algueró C, Martins C, Rodrigues OR, da Fonseca IP, et al. Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;137(3–4):275–83.
206. Miranda S, Martorell S, Costa M, Ferrer L, Ramis A. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Vet Parasitol*. 2007;144(3–4):251–60.
207. Moore PF, Rossitto P V., Danilenko DM, Wielenga JJ, Raff RF, Severns E. Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. *Tissue Antigens*. 1992;40(2):75–85.
208. Goddeeris BM, Morrison WI, Naessens J, Magondu JG. The bovine autologous mixed leukocyte reaction: A proliferative response of non-T cells under the control of monocytes. *Immunobiology* [Internet]. 1987;176(1–2):47–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0171-2985\(87\)80099-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0171-2985(87)80099-2)
209. Nathan C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173–82.
210. Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol*. 2008;84(2):389–96.
211. Freire-de-Lima CG, Yi QX, Gardai SJ, Bratton DL, Schiemann WP, Henson PM. Apoptotic cells, through transforming growth factor- β , coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem*. 2006;281(50):38376–84.

212. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalderon JR, Girikontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells [9]. *Nature*. 1997;390(6658):350–1.
213. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nat Rev Immunol*. 2000;407(October):784–8.
214. Galvis-Ovallos F, Casanova C, Pimentel Bergamaschi D, Bianchi Galati EA. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Apr 2;12(4).

9. Apêndice

Original Article

Cell phenotypic markers of dogs with Visceral Leishmaniasis in *ex vivo*

Giulia da Silva Lopes¹, Cecília Fiuza Favali¹

1.Universidade de Brasília – Núcleo de Medicina Tropical

Abstract

Introduction: Canine Visceral Leishmaniasis (LVC) is a vector-borne zoonosis caused by *Leishmania infantum*, in Brazil. LVC presents a broad clinical spectrum, from the asymptomatic to the symptomatic form. However, there are few studies characterizing the expression of cell surface molecules in canine leukocytes, mainly differentiating symptomatic from asymptomatic dogs. **Objective:** To characterize the percentage and phenotype of monocytes and lymphocytes of dogs with LVC, symptomatic and asymptomatic. **Methodology:** Samples of 15 dogs from the Distrito Federal (Brazil), naturally infected, were distributed in three groups: uninfected dogs (NI), asymptomatic infected dogs (IAS) and symptomatic infected dogs (IS). Cellular phenotypes of monocytes (CD14 + MHC-II +) T lymphocytes (CD3 +, CD4 +, CD25 +, CD8 +), B lymphocytes (CD19 + CD25 +) and the induction of cell death by the parasite in PBMCs were analyzed, in an *Ex vivo* context. Additionally, the analysis *In vitro* was performed using antigens from *L. infantum*, soluble and recombinant (ADF/Cofilina and RAB1-GTPase), as treatments for the cells mentioned above. **Results:** Lower frequency of circulating monocytes (CD14 + MHC-II +), as well as low expression of CD44, in the IS group, suggesting that the function of antigen presentation in monocyte was compromised. Depletion of TCD4 + cells, in the IS group, in the IS and IAS groups, and lymphocyte anergy after treatment with SLA, seems to be characteristics of the LVC susceptibility profile. The recombinant proteins used in the study need to be better understood to identify their immunogenic potential and possible use in diagnostic methods. In the evaluation of cell death, its modulation by the parasite was demonstrated in dogs with LVC, this strategy was used as to evade the immune system. **Conclusion:** There are some biomarkers, based on molecules expression and percentage of monocytes and lymphocytes, described in this study that can be used to identify the prognostic and the susceptibility or resistance profile in each host. It may be useful for futures studies regarding treatments, diagnosis and prophylaxis.

Keywords: SLA, leukocytes, *Leishmania infantum*, cell surface molecules.

Contact: giuliadslopes@gmail.com

INTRODUCTION

Neglected Tropical Diseases (NTDs) form a group of 17 of infectious diseases that affect more than one billion people worldwide and are predominantly associated with the poorest populations in tropical and subtropical environments (1–3). Visceral Leishmaniasis (VL) is a zoonosis of the NTD group, which affects internal organs, presenting a risk of death when untreated. This NTD has a wide worldwide distribution and Brazil is one of the 11 countries that concentrate 88% of the global incidence of the disease in humans and fits in the group of countries with expanding transmission, with emphasis on the visceral form of the

pathology (4,5).

Visceral Leishmaniasis manifests itself in other species of mammals, domestic dogs being considered the main natural reservoirs of the disease in the domestic cycle (6) and are recognized as the most important cause of the rapid distribution of the disease between humans and other dogs in endemic areas (7). Canine infection has preceded, then, the occurrence of human cases and the prevalence of the disease has been higher in dogs than in humans and, in this case, it is called Canine Visceral Leishmaniasis (LVC) (8).

LVC is distributed in more than 50 countries in Africa, Asia, Europe and the

Americas (9). In endemic areas, it is estimated that 90 to 95% of dogs are clinically healthy and only 5 to 10% have clinical signs of the disease. According to data from the Ministry of Health, Brazil accounts for 90% of LVC cases in Latin America. We have reports of cases of CVL in all regions of Brazil, including the southern region (10,11). In Brasília (DF), a study carried out between January and October 2013 presented a survey of data from the city's Zoonosis Control Center (CCZ), in which 6,413 dogs were tested and confirmed 590 infected dogs, which corresponds to 9.2% of all dogs examined (12).

The etiological agents that cause Visceral Leishmaniasis are trypanosomatous protozoa. In Brazil, this disease is a zoonosis commonly caused by the species *Leishmania infantum* and is transmitted mainly by female sand flies of the species *Lutzomyia longipalpis*. More recently, the species *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia cruzi* have also been identified as vectors of VL (13,14).

The infection can result in asymptomatic animals that appear to be healthy and those symptomatic in more severe stages of the disease (15). The clinical signs of CVL begin with a lesion at the site of inoculation of the parasite, ulcerative that regresses in a variable number of days and then begins the silent

period of the infection with slow evolution and degree of severity (9).

As mandatory intracellular parasites, *Leishmania* can infect several cells, but preferably mononuclear phagocytes, then hepatocytes endothelial cells, eosinophils and neutrophils from various tissues and organs of dogs mononuclear phagocytic cells, hepatocytes endothelial cells, eosinophils, neutrophils. Neutrophils are the first immune cells to migrate to the site of infection. With the ability to phagocyte and eliminate parasites, but some studies report the parasite's ability to modulate the neutrophil response, delaying the programmed cell death of neutrophils and prolonging its life span (16). This phenomenon may favor the infection of cells presenting antigens (APCs), the strategy of silent infection is called the "Trojan Horse" (17). The DCs and macrophages (APCs) have the function of processing and presenting the parasite antigens by means of the molecules of the major histocompatibility complex (MHC) to the effector T cells (16). This process marks the initiation of the host's adaptive immune response (18).

The adaptive immune response against *Leishmania* spp. it is dependent on T and B lymphocytes, mainly on type I (Th1) helper T lymphocytes, referring to the activation of the protective inflammatory immune response (19). Even

so, CD8 + T lymphocytes are essential, as they are able to lyse infected cells and provide a decrease in parasitic load (16). The ineffectiveness in activating cell-mediated immunity leads to polarization to the Th2 profile, which allows the parasite to reproduce and spread through the host's body in an uncontrolled manner. The balance between the two profiles depends on each host and its genetic load, but those that respond with the Th1 profile are more resistant to infection than those with the Th2 profile (16). In human DCs, *Leishmania infantum* is also able to inhibit death by apoptosis of these cells, using this prolongation of DC life as a mechanism for evading the immune response (20).

The diagnosis of CVL is complex. Clinical diagnosis is of low sensitivity in identifying cases of asymptomatic dogs (5,21,22). Therefore, CVL is diagnosed through a combination of clinical findings, serological and parasitological tests (8,23). Therefore, it is necessary to use diagnostic methods that are specific, sensitive, easy to access, simple to perform and easy to interpret (24,25). Thus, it is necessary to understand the modulations caused by antigens, caused by infection by *L. infantum*, in canine cells presenting antigen and in lymphocytes, with their respective phenotypic markers. Furthermore, understanding the activation of leukocytes stimulated by *L. infantum*

antigens, soluble and recombinant, can contribute to the choice of more appropriate therapeutic approaches for infection control, to the development of prognostic markers and more sensitive and specific diagnostic methods. than currently used.

METHODS

Culture of *Leishmania infantum*

L. infantum (MHOM/BR/1974/PP75), foram utilizadas para produção do Antígeno Solúvel de *Leishmania* (SLA). Parasitos foram descongelados e ressuspensos em meio Schneider completo, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), 1% de antibiótico Penicilina-Estreptomicina 100X (Gibco®). Cultivadas em meio NNN e incubadas a 25 °C por 72 horas, transferidas para meio Schneider suplementado. As promastigotas foram obtidas de culturas em fase estacionária (5-7 dias), com menos de cinco passagens *In vitro*.

Obtaining the soluble antigen (SLA) of *Leishmania infantum*

Leishmania promastigotes were collected and centrifuged at 4°C for 15 minutes at 750 g, twice, in sterile PBS saline (phosphate buffer) 1 X sterile and frozen. The promastigotes were thawed at 4 ° C, centrifuged at 750 g for 15 minutes and resuspended in sterile distilled water. Then they were broken by sudden freezing,

in a freezer -80°C for 15 minutes, alternating with the water bath at 37°C , for six times, and the 5.0 MHz ultrasound action was applied, making six series of 30 seconds with intervals of 1 minute. After being centrifuged, for 60 minutes, at 4°C and 14,000 g, then filtered through a $0.22\mu\text{m}$ membrane for protein dosing, these were aliquoted in volumes of $500\mu\text{L}$ and stored at -20°C (161).

Dosage of SLA of *L.infantum* – Qubit™

SLA quantification was performed with the Qubit™ kit (Invitrogen). The fluorescent reagent was prepared from the solution containing fluorophore and kit buffer, in the proportion of 1: 200. Then, aliquots of SLA diluted in milliQ water (1: 3) were added to the reagent, incubated for 15 minutes and analyzed.

Obtaining recombinant antigens from *L.infantum*

The recombinant proteins Rab-1 GTPase and ADF / Cofilina were obtained by the master Gisele Lorrana Silva Santos from the laboratory of Professor Doctor Vicente de Paulo Martins, from the Department of Cell Biology of the Institute of Biological Sciences of the University of Brasília. For this purpose, *in silico* analyzes were performed, and the signal peptides of each protein were identified using the SignalP Server v program. 4.1.

Phosphorylation was predicted using the NetPhos 3.1 program (163), and glycosylation by YinOYang 1.2 (164). Then, linear prediction and conformational analysis of cells were performed. Conserved and relevant gene and protein sequences that were of interest to both proteins were identified. Then PCR for the amplification of the genomic DNA sequence encoding the proteins of interest were made, using specific primers. The cloning and expression of Rab-1 GTPase and ADF / Cofilina was done. in competent cells, able to receive exogenous DNA, in a prokaryotic system with DH5- α , TOP10 and Rosetta BL21 (DE3) pLYss™ lineage from Escherichia coli. Finally, when the purity and specificity of the genes encoding the proteins is identified, the heterologous expression of the Rab-1 GTPase and ADF / Cofilina proteins is made in E. coli Rosetta. The proteins were purified by Mobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) and analysis of protein expression, purification and solubility in Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). The performance of proteins was tested by ELISA to assess the ability to induce antibody production.

Study groups

The study groups were selected and divided into three groups. Symptomatic: dogs with a compatible

epidemiological history, apparent clinical signs and with positive DPP and ELISA serological tests. Asymptomatic: dogs with a compatible epidemiological history, without clinical signs and with positive DPP and ELISA serological diagnostic tests. Not infected: dogs with or without a compatible epidemiological history, with no clinical signs and with a negative DPP serological diagnostic test were not infected. All tests carried out by the CCZ Zoonosis Control Center in Brasília / DF.

Obtaining PBMCs

Blood samples from dogs from (CCZ), in a project approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Institute of Biological Sciences of the University of Brasília (UnBDoC n° 106668/2014). Peripheral blood was collected in sodium heparin tubes (eBioscience). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from blood samples were obtained by density density in Ficoll (GE Healthcare) according to the Trajano-Silva protocol (165). The blood was diluted in sterile PBS 1X in a 1: 2 ratio and poured over Ficoll in a 1: 2 ratio, without mixing the phases. Centrifuged at 900g for 30 minutes at 25 ° C. The PBMC cloud was collected washed twice in PBS 1x at 4 ° C. The pellet was resuspended in RPMI for counting with Tripan blue. Part of the cells was used for ex vivo analyzes

taken directly for cytometry analysis, without stimulation, and the rest for cell culture, for the in vitro experiment.

Cyto centrifugation

To assess the purity of the separation, a Cytospin protocol with a volume of 5×10^5 stained with panotype chlorination (NEWPROV) was evaluated by optical microscopy.

Cell culture and stimulation - In vitro

The cells were adjusted to 5×10^6 / ml and cultured in RPMI 1640 supplemented and stimulated with soluble *Leishmania infantum* antigen (10 μ g / mL), with the recombinant proteins Rab-1 GTPase and ADF / Cofilina (1 μ g / mL) and LPS (100 ng / ml). Then grown in 24-well plates (Greiner Bio-One) at 37 °C, in a CO₂ greenhouse for 48 hours.

Marking for flow cytometry analysis

The cells were collected in 1.5mL eppendorf tubes, washed once with 1X PBS and centrifuged for 10 minutes at 500xg and 4°C, resuspended in 1X FACS buffer, with 10⁵ cells for blocking for 10 minutes, then added 200uL of FACS buffer 1X to the cells and they were then washed and centrifuged at 500xg at 4°C for 5 minutes. 20uL of the antibodies were added, at 1:20 dilution and in 1X FACS buffer and incubated at 4°C, for 30 minutes in the dark with anti-CD3 antibodies

(conjugated to FITC), anti-CD4 (conjugated to APC), anti-CD8 (conjugated to PE), anti-CD14 (conjugated to PE), anti-CD19 (conjugated to FITC), anti-MHCII (PerCP-Cy5.5), anti-CD44 (conjugated to FITC), anti-CD25 (conjugated to PE), all antibodies reactive to canine cells. After being washed to remove free, unconjugated antibodies and taken to cytometry.

Detection of cell death in leukocytes

Cell death was analyzed in the ex vivo and in vitro groups. Then the cells were marked with AnnexinV-FITC (eBioscience) and Propidium Iodide. The separated cells were centrifuged with 200uL of FACS buffer at 500xg, at 4°C for 5 minutes, placed in a 1.5 ml eppendorf tube, in 1X binding buffer with 5x10⁵ cells, added 5uL of Annexin V, incubated for 10 minutes at room temperature. Then washed with PBS, resuspended in 190uL of binding buffer and 10uL of Propidium Iodide and then acquired in a FACS Verse cytometer (BD Biosciences), using the FACS SUITE Software. The graphs generated by flow cytometry were analyzed using the FlowJo Software (Flowjo® version 10).

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using GraphPad-Prism 10.0

(GraphPad Software Inc). The labeled cells and medium fluorescence intensity, identified in the previous analysis, were tested with the Shapiro – Wilk normality test. Presenting normality, and submitted to the Kruskal-Wallis test, as this test comprises the analysis of multiple comparisons. The three groups were compared and analyzed in the Dunnet post-test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Sample characteristics

To carry out the study, samples of symptomatic and asymptomatic, non-infected dogs were collected from peripheral blood. The identification cards of each animal, containing epidemiological and clinical data of the dogs participating in the study, were filled out with the help of a veterinarian. The samples were collected from 15 dogs which were allocated in three groups. Those with positive results for both tests, DPP and ELISA, were classified as LVC (symptomatic and asymptomatic). Those with negative serology, negative PPD result, were classified as uninfected. Thus, four dogs were allocated to the non-infected group, six to the asymptomatic infected group and five to the symptomatic infected group (Table1).

Table 1: Study groups and frequency.

<i>Groups</i>	<i>Frequency</i>
<i>Not infected</i>	4 (26,7%)
<i>Asymptomatic</i>	6 (40%)
<i>Symptomatic</i>	5 (33,3%)
<i>Total</i>	15 (100%)

Then, the clinical signs presented by the dogs in the symptomatic group were listed and the frequencies of each clinical sign within that group were calculated (Table 2).

Table 2: Clinical signs in 5 dogs in the Federal District (DF), naturally affected by visceral leishmaniasis.

Clinical signs	Frequency
Dermatological lesions	3 (60%)
Omicogrifosis	5 (100%)
Ocular lesions	2 (40%)
Alopécia	5 (100%)
Cachexy	2 (40%)

The epidemiological data of the infected dogs, belonging to the group of infected symptomatic and asymptomatic dogs, were categorized by age group, sex, size, breed and coat (Table 4).

Table 4: Phenotypic characteristics and age group of 11 infected dogs from Distrito Federal (DF), naturally affected by visceral leishmaniasis.

Chacateristics	Frequency	
Age	0-2	3 (27,3%)
	2-4	2 (18,2%)
	4-6	2 (18,2%)
	6-8	1 (9,10%)
	8-10	1 (9,10%)
	Not Determined	2 (18,2%)
	Sex	Female
Male		3 (27,3%)
Size	Small	6 (54,5%)
	Medium	2 (18,2%)
	Big	2 (18,2%)
	Not Determined	1 (9,10%)
Breed	German Shepard	2 (18,2%)
	Pinscher	1 (9,10%)
	Not Determined	8 (72,7%)
	Not Determined	1 (9,10%)
Coat	Small	9 (81,8%)
	Medium	1 (9,10%)
	Not informed	1 (9,10%)

Most of the dogs come from the administrative regions closest to DIVAL, since 18.2% of them lived in Fercal, 36.3% in Sobradinho, 27.3% were residents of Lago Norte. The origin was unknown in 18.2% of the cases (Table 6).

Table 6: Administrative regions from where 11 infected dogs came from the Federal District (DF), naturally affected by visceral leishmaniasis.

Administrative Regions	Frequency
Fercal	2 (18,2%)
Sobradinho	4 (36,3%)
Lago Norte	3 (27,3%)
Não informada	2 (18,2%)

Obtaining PBMCs

After obtaining blood samples, they were subjected to Ficoll density gradient separation, and the leukocyte cloud cells were collected and fixed on microscopic slides, by the cytocentrifugation process. Subsequently, these cells were stained with panotic and analyzed under an optical microscope, when the presence of segmented nucleus cells, which by morphology suggested to be polymorphonuclear cells (PNMs), or neutrophils (Figure 1).

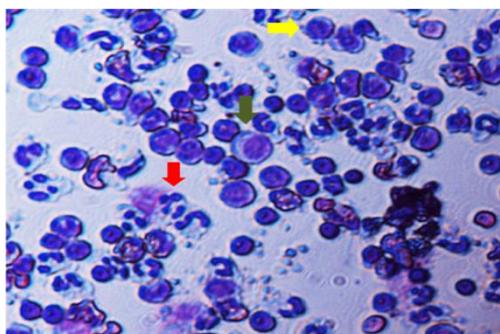


Figure 1. Representative image of cells collected after density gradient separation with Ficoll. The slide with

sample of cells collected after performing the PBMC separation protocol was analyzed under optical microscopy (100x), showing a high number of cells with segmented nucleus, PMN (red arrow), monocyte (green arrow) and lymphocyte (yellow arrow).

Strategy of analysis

After collecting the blood and obtaining the PBMCs, they were marked for analysis of Ex vivo surface molecules, on the same day, with the fluorescences combined in three “MIX” (antibody combinations) and analyzed by cytometry of flow. The markings made were for the phenotypic characterization of T lymphocytes, B lymphocytes and canine monocytes. For this, the following analysis strategy was performed: the lymphocyte and monocyte populations were adjusted and selected in a "gate", according to the granularity (SSC) and size (FSC) information, reported in the literature. After selecting the population of interest, the percentage of expression and MFI of the target molecules were analyzed, differentiating into lymphocytes and monocytes (Figure 2). The same process occurred with all the molecules.

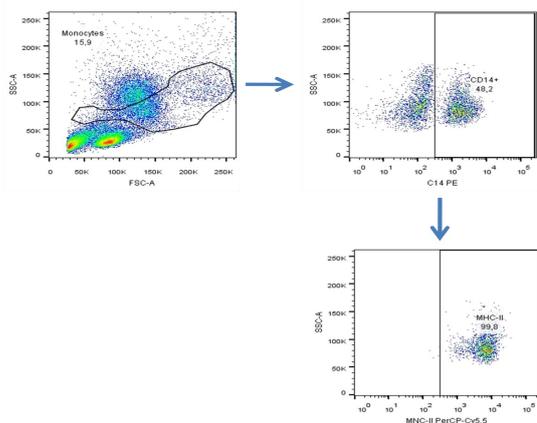


Figure 2. Representative image of the analysis strategy for phenotypic characterization of monocytes. It represents the analysis strategy for the characterization of monocytes, with the labeling of cells that express the CD14 molecules and MHC-II molecules, within the group of CD14 + cells. Each point represents an acquired cell (pseudocolor).

Phenotypic characterization of monocytes - Ex vivo

For the characterization of canine monocytes, the CD14, MHC-II and CD44 molecules were marked. The CD44 molecule, widely expressed in leukocytes, was detected in the three groups, and in NI (88.35% \pm 2.582) and IS (90.70% \pm 9.225) the percentage of positive cells for this molecule was similar. The IAS group, in turn, expressed less CD44 in monocytes (69.00% \pm 13.47), but without significance (Figure 3A). The CD14 + population was present in similar proportions in the three groups, in NI (34.45% \pm 11.36), IAS (39.00% \pm 7,410) and IS (27.90% \pm 7.048) (Figure 3B). The percentage of CD14 + MHC-II + cells, the monocytes, was higher in the NI group (88.95% \pm 8.825), whereas in the infected groups this

population was present in a smaller amount, IAS (66.15% \pm 3.968) and IS (58.70% \pm 8,491), but this difference between groups was not statistically significant (Figure 3C).

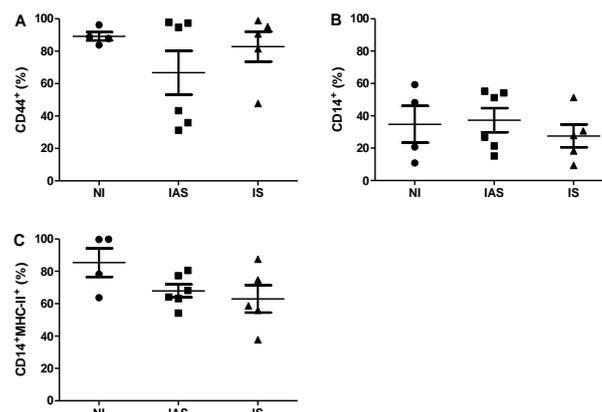


Figure 3. Ex vivo characterization of monocytes from uninfected, symptomatic and asymptomatic dogs. The figures represent the quantification of the percentage of cells expressing CD44 (A), CD14 (B) and the MHC-II molecule in CD14 + cells, in the samples of the NI, IAS and IS groups. Each point represents an individual analyzed (median \pm standard deviation), * $p < 0.05$.

Fluorescence Intensity Means (MFI) in each group was also analyzed to identify the amount of molecules expressed on the surface of the marked molecules. This information is interesting for the phenotypic characterization of monocytes. The CD44 molecule was more expressed in cells of dogs belonging to the NI group (3209 \pm 367.2), while we observed a decrease in the second group compared to the first, IAS group (1790 \pm 267.5), as well as the third, IS (1454 \pm 284.0), this difference being significant

(Figure 4A). As for the expression of CD14, this molecule was more expressed in the NI group (3388 +/- 954.2) and decreased its expression in the cells of dogs in the groups IAS (1628 +/- 519.8) and IS (3094 +/- 527.8), and this decrease was not significant (Figure 4B). Regarding the expression of MHC-II within the group of CD14+ cells, similar expressions were observed between the NI (3347 +/- 1211) and IAS (3497 +/- 521.4) groups, while in relation to the other two, the IS group (2492 +/- 364.9) showed a non-significant decrease (Figure 4C).

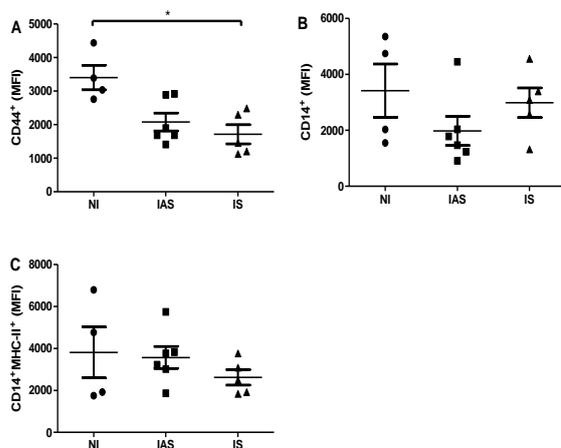


Figure 4. Mean fluorescence intensity (MFI) of molecules expressed by monocytes, in an Ex vivo approach. Quantification of the expression of CD44 (A), CD14 (B) and MHC-II molecules expressed in CD14 + (C) cells, in NI, IAS and IS groups. Each point represents an individual analyzed (median +/- standard deviation), * p < 0.05.

Phenotypic characterization of lymphocytes - Ex vivo

In the canine lymphocyte characterization process, the CD4, CD25 and CD19 molecules were marked to

identify the T lymphocyte and B lymphocyte population. The CD19 + molecule characterizes the B lymphocyte population, both immature, when naive and mature. Thus, the population of circulating B lymphocytes was lower in the NI (10.80% +/- 4,435) and IAS (9,355% +/- 14.69) groups and higher in the IS (17.60% +/- 6,796), although there is no significant difference between them (Figure 5A). The CD4+ CD25+ population, on the other hand, varied little between the NI (20.85% +/- 5,341), IAS (13.30% +/- 2,994) and IS (10.10% +/- 6,723) groups (Figure 5B). CD19 + and CD25 + cells, B lymphocytes, were more present in the NI group (40.70% +/- 1,612) than in the IAS (24.90% +/- 7,952) and IS (27.30% +/- 11.75), but without significant difference (Figure 5C).

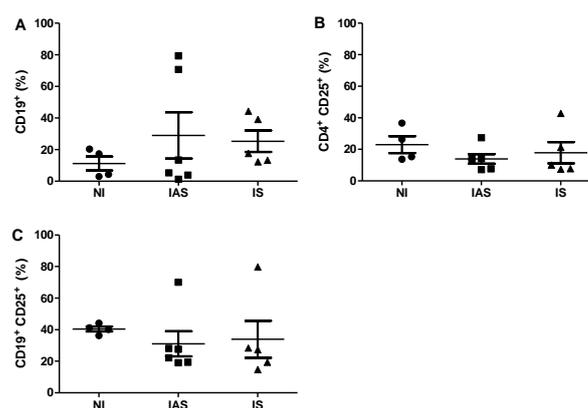


Figure 5. Ex vivo characterization of T and B lymphocytes from uninfected, symptomatic and asymptomatic dogs. (A) Represents the percentage of monocytes expressing CD19 + molecules in the NI, IAS and IS groups. Figure (B) shows the percentage of activated T lymphocyte cells, with CD4 + and CD25 + marking and (C) B, CD19 + CD25 + lymphocytes, in

each group (NI, IAS and IS). Each point represents an groups. Each point represents an individual analyzed individual analyzed (median +/- standard deviation), * p (median +/- standard deviation), * p <0.05. <0.05.

MFI was also quantified for phenotypic characterization of T and B lymphocytes. For the CD19 molecule, there was greater expression in the IS group (3848 +/- 242.6), median expression in the IAS group (2430 +/- 657.8), and the lowest expression was in the NI group (1214 +/- 254.4) (Figure 6A). The expression of CD25 in the group of CD4 + cells was also measured and it was observed that NI (1775 +/- 125.2), IAS (2136 +/- 174.3) and IS (1477 +/- 1166) showed similar expressions, without significant difference (Figure 6B). Higher fluorescence intensity was detected in the CD25 molecule in CD19 + cells, with the highest values in the NI (1313 +/- 493.9) and IAS (1092 +/- 673.6) groups, when compared to the IS (1158 +/- 89.85) (Figure 6C).

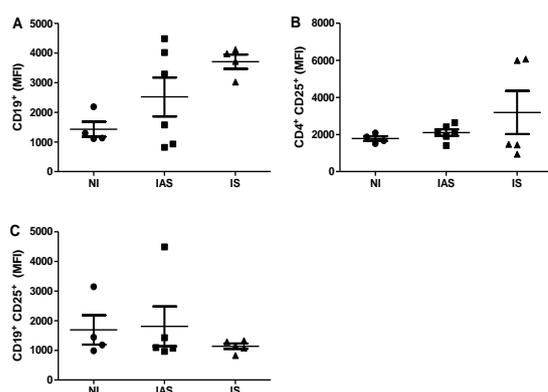


Figure 6. Mean fluorescence intensity (MFI) of molecules expressed by T and B lymphocytes, in an Ex vivo approach. (A) Represents the quantification of CD19 molecules of B lymphocytes belonging to the NI, IAS and IS groups. (B) Shows the percentage of activated T lymphocytes, CD4 + and CD25 +, while figure (C) shows the percentage of B lymphocytes, CD19 + and CD25 +, in the samples of dogs belonging to the NI, IAS and IS

In addition, the CD3, CD4 and CD8 molecules were labeled, which, when used together, are phenotypic markers of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes. When labeling CD3+ CD4+ cells, TCD4+ lymphocytes, similar percentages of labeled cells were observed in the three groups, NI (39.10% +/- 8,197), IAS (37.75% +/- 5,340) IS (34.40% +/- 3,088) (Figure 7A). For the identification of TCD8+ cells, markings were made with TCD3 and TCD8, and the NI group (47.50% +/- 9,221) had a higher percentage of positive cells, while the IAS groups (25.75% +/- 3,370) and IS (28.70% +/- 10,49) lower, but the difference was not significant (Figure 7B).

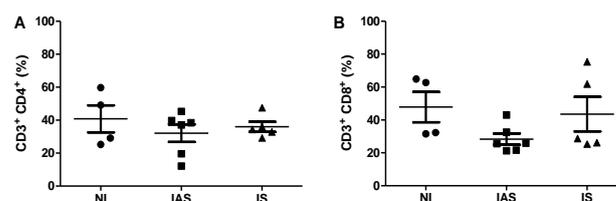


Figure 13. Ex vivo characterization of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes from uninfected, symptomatic and asymptomatic dogs. (A) Represents the percentage of CD3+ CD4+ cells and (B) the percentage of CD3+ CD8+ in samples from dogs belonging to the NI, IAS and IS groups. Each point represents an individual analyzed (median +/- standard deviation), * p <0.05.

To characterize the amount of molecules expressed on the cell surface of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes, MFI was performed, quantifying the expression

of each molecule. Within the group of CD3⁺ cells, the expression of the CD4 molecule was analyzed, and greater expression of this molecule was observed in the IS group (8609 +/-1073), showing a significant difference in relation to the IAS group (5306+/-882.5), while the NI group (5394+/-34.82) had intermediate expression, with no significant difference in relation to the other groups (Figure 8A). The expression of CD8 molecules in the population of CD3⁺ cells was very similar between the NI (4320+/-1999), IAS (4020+/-835.1) and IS (5506+/- 455.4) groups (Figure 8B).

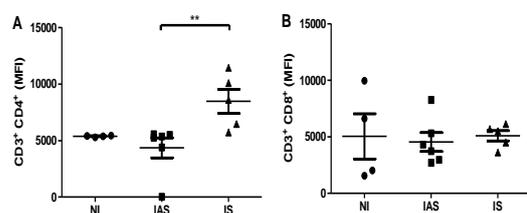


Figure 8. Mean fluorescence intensity (MFI) of the expression of CD4 and CD8 molecules in CD3⁺ lymphocytes, in an Ex vivo approach. Quantification of CD4 (A) and CD8 (B) molecules expressed in CD3⁺ cells, belonging to dog samples from each of the NI, IAS and IS groups. Each point represents an individual analyzed (median +/- standard deviation), * p < 0.05.

Discussion

Canine Visceral Leishmaniasis has a wide spectrum of clinical and pathological changes, ranging from an asymptomatic infection to a serious disease that can lead to death (26). The profile of resistance to infection is associated with the development of an immune response

mediated by cells, mainly TCD4 and TCD8 lymphocytes, while the susceptibility profile is associated with the production of high levels of antibodies (27). The characterization of the cells involved in these processes can be extremely important for the identification of prognosis and monitoring of infected dogs, as well as for the improvement in the development of immunoprophylaxis and therapeutic approaches. In this work, samples of dogs with LVC, naturally infected, symptomatic (IS) and asymptomatic (IAS), and uninfected dogs (NI) from DF, were used. Therefore, the aim was to observe if there are patterns between dogs in the same study group and what are the differences between groups.

The percentage of infected symptomatic dogs in this study was 33.3% (Table 1). The clinical signs observed in this group were listed in Table 2. The cellular response profile that promotes the secretion of TGF- β and IL-4, anti-inflammatory cytokines that promote the Th2 profile and the maintenance of an important humoral response, which in turn it is strongly related to the clinical signs of the disease (28–30). The deposition of immune complexes is one of the main causes of the clinical signs of CVL (31).

In the present study, we obtained 40% of samples from asymptomatic infected dogs (Table 1). According to Reis

and collaborators, asymptomatic dogs have high levels of IFN- γ , related to the maintenance of a protective response, of the Th1 profile, which prevents the development of clinical signs (61). In addition, there is proliferation of TCD4 + lymphocytes and activation of TCD8 + lymphocytes in asymptomatic dogs infected with *L. infantum*, which generates the protective response in these individuals (28,32).

The phenotypic characteristics, breed, sex and age of dogs can be related to the variation of leukocytes and their proportions in each individual. The work of Faldyna and collaborators highlights such differences in a study, in which they described that the distribution of lymphocytes in the peripheral blood of dogs varies according to age. However, the authors also observed significant differences in the percentage of lymphocytes between the different breeds observed. However, in the differences between the sexes, they found no significant differences in relation to the percentage of each population of T and B lymphocytes (33). However, the samples in this study show individuals belonging to different age groups, and the vast majority, do not have a specific race (72.7%) (Table 3). This fact is relevant, since the genetic variability and the diversity of phenotypes found in this sample may be related to the

different immune response pattern between individuals.

The dog's place of origin is also an important feature, since LVC is a vector-borne parasitic disease, environmental issues can increase the likelihood of dogs being infected. Most dogs belonging to the infected group in our sample come from the three administrative regions of the DF with the highest number of confirmed cases of CVL (12). In a survey carried out by Herênio and collaborators of the CCZ data from Brasília, identified in Sobradinho, 108 cases in Lago Norte 102 cases in Fercal (12). In this study, we identified that 36.3% of our sample of infected, symptomatic and asymptomatic dogs, came from Sobradinho, 23.3% from Lago Norte and 18.2% from Fercal (Table 4). Such results are consistent with the high number of confirmed cases of CVL in the work of Herênio and collaborators (12).

In an attempt to obtain PBMCs, after separation by density gradient with only one Ficoll, it was observed that there was no purity of mononuclear cells with this methodology, as a high proportion of polymorphonuclear cells (PNMs) was identified, morphology, it is suggested that they are neutrophils (Figure 1). The protocol used was described by Trajano-Silva (34) and has been adopted in other studies with dogs (35–38) . Buurman and

collaborators, however, described the similarity in the density of canine neutrophils and lymphocytes, a characteristic that does not allow the separation of these populations by a phase density gradient (39). Therefore, for dogs there can be significant contamination of PNMNs using this technique (40).

According to Bruin and collaborators, a prerequisite for developing an adequate *in vitro* analysis is to obtain relatively pure populations of PBMCs from whole peripheral blood (40). In ruminant PBMC cultures, it was observed that contamination by PMNs affected the result of the analysis of lymphocyte proliferation, inhibiting it and causing variations (41). Therefore, we chose to seek the standardization of a new separation protocol by discontinuous gradient, with the use of Percoll in two phases with different concentrations, in order to propose a new methodology that is efficient and simplified, a process that is underway.

The first molecule analyzed, CD44, had a similar percentage of CD44 + cells between groups, with only the IAS showing a small decrease in positive cells, yet showing 69% positivity (Figure 3A). However, CD44 + cells in uninfected dogs showed greater expression of this molecule than the other groups, showing a significant difference in relation to the IS

(Figure 4A). The high expression of the CD44 molecule in T lymphocytes is a characteristic of activation of these cells after the encounter with the cognate antigen (42). The expression of this molecule also seems to be mandatory for the migration of DCs from peripheral organs to the lymph node, allowing the presentation of antigens to the lymphocytes (43). Thus, the greater expression of this molecule in monocytes of NI dogs may indicate a more effective antigen presentation function in this group than in the IS group.

Then, circulating monocytes were identified. A lower percentage of monocytes CD14+ cells was observed in the results in the IS group (27.90%) than in the other two groups, IAS (39%) and NI (34.45%) (Figure 3B). However, the CD14 molecule was more expressed in NI groups than in the other groups (Figure 4B). The CD14 molecule is generally used in the identification of monocytes (44), therefore, it is suggested that the IS group has a lower percentage of CD14+ monocytes. This result is consistent with the study by Reis and collaborators, who observed a lower percentage of CD14 + monocytes circulating in peripheral blood in the IS group than in the NI group (45). The reduction in the percentage of circulating CD14 + monocytes in IS dogs suggests that the monocytes migrate to the

infection sites, where they act as APC, which highlights their fundamental role in infection control (26,45) (61,167).

Inside the CD14 + population, a higher proportion of MHC-II+ cells was observed in the NI group when compared to the IAS and IS groups (Figure 3C), and the expression of this molecule was higher in the NI and IAS groups and lower in the IS group (Figure 4C). This characteristic in the NI and IAS groups could facilitate the presentation of antigens to the lymphocytes. Similar results were presented in one study, with greater expression of the MHC-II molecule in NI and IAS dogs than in IS dogs, which shows less expression of this molecule (45). Reis and collaborators observed a low frequency of circulating monocytes in dogs with CVL, presenting itself as a mark of the disease, which corroborates the results found in Figure 3C (45).

Our results regarding the percentage of CD19+ B lymphocytes, Ex vivo, showed a low median of up to 17% (Figure 5A) and the infected groups showed a higher percentage of CD19+ cells, when compared to the NI group (Figure 5A). As well as greater expression of this molecule in the IS group showed the highest expression of the CD19 molecule (Figure 6A). A similar pattern was observed in CD19+ CD25+ cells (Figures 5C and 6C). However, these

results are in contrast to the studies by Reis and collaborators, who observed a decrease in circulating B lymphocytes in IS dogs compared to IAS and NI. At the same time, they observed greater production of antibodies: IgG, IgG2, IgM, IgE and IgA (26). This decrease in circulating B lymphocytes and high production of antibodies can be explained by the differentiation of these cells into plasmocytes, initiating the polyclonal activity of B lymphocytes (46). A pronounced humoral response against *Leishmania* causes the production of high levels of non-protective antibodies (47,48). These data characterize the polyclonal response of B lymphocytes as a characteristic of susceptibility to CVL and to the development of the clinical signs characteristic of the disease (49).

The CD4+ CD25 + population had a low percentage, reaching up to 20% in NI, and lower percentages in the other groups (Figure 5B). However, MFI showed similar expression of the CD25 molecule, in CD4 + cells, in all groups (Figure 6B). In humans and mice, CD4 + CD25 + cells are generally identified as regulatory T lymphocytes (Treg), usually still marked with Foxp3 (CD4+CD25high Foxp3+) (50,51), which have the function of regulating both Th1 and Th2 responses (52). However, a high expression of CD25 may still indicate activated T lymphocytes.

The lack of these specific markers in the study and the difficulty of finding such markers for dogs were presented as a limitation of this work.

In the results we observed different percentages of CD3+ CD4 + cells in the three groups, with the percentages of 39% in NI, 37% in IAS and 34% in IS (Figure 7A). Despite the small difference, these data corroborate the findings of the research group of Reis, who observed a decrease in TCD4 + cells in the SI group in relation to the other groups (45). Such depletion may be associated with an ineffective protective response, despite the presence of TCD8+ lymphocytes in infected dogs, as the absence of TCD4+ lymphocytes prevents the development of the effector action of TCD8 + cells, which appears to be dependent on IFN- γ , enabling the progression of disease, being a immunosuppressive profile in dogs (37,53). However, the expression of CD4 molecules, in the MFI analysis, showed a significant increase of this molecule in the IS group in relation to the IAS group (Figure 8A). The function of the CD4 molecule during infection is related to the activation of lymphocytes, however, this molecule is widely expressed in other canine leukocytes, such as monocytes and neutrophils, and its function still seems to be little known and underestimated (54).

In the results related to the TCD8+

lymphocyte population, we observed a higher percentage of CD3+ CD8+ cells in the IS group (28%) than in the IAS group (25%) (Figure 7B). This result contradicts the data described in the work of Reis and collaborators, in which a higher percentage of TCD8 + cells was observed in IAS dogs than in IS dogs, suggesting then that high levels of TCD8 + cells may be a characteristic that marks asymptomatic dogs (45). Lymphopenia has also been observed in dogs infected with *L. infantum*, being associated with an immunosuppressive profile (26,55). Finally, it was suggested that the interaction between TCD4+ and TCD8+ cells is important for the activation of toxicity and that this activation is probably dependent on IFN- γ (37,53). The MFI results, in turn, showed uniformity between the groups with regard to the expression of CD8 molecules (Figure 8B). This molecule is related to the activation of lymphocytes, together with the TCR, and the result, it is suggested that the expression of this molecule does not vary despite the infection and clinical signs.

Conclusion

The lower frequency of circulating monocytes and depletion of TCD4 + cells, the higher percentage of Treg cells and the lymphocyte anergy in the treatment with SLA are characteristics of the LVC

susceptibility profile, observed in the IS group. While higher percentages of circulating monocytes and lymphocytes (T and B) are characteristics of the resistance profile to infection by *L. infantum*, identified in the IAS group. Some biomarkers based on the expression of molecules and percentage of monocytes and lymphocytes, described in this study, can be used to identify the host's susceptibility or resistance profile. These data may be useful for future studies related to treatment, diagnosis and immunoprophylaxis.

References

- Galvis-Ovallos F, Casanova C, Pimentel Bergamaschi D, Bianchi Galati EA. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Apr 2;12(4).
- Molyneux DH, Savioli L, Engels D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *Lancet* [Internet]. 2017;389(10066):312–25. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30171-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30171-4)
- WHO. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Cholera. 2015.
- OPS/OMS OP de la S. Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas. *Inf Leishmaniasis*. 2016;4:3–7.
- OMS. WHO: Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Heal Organ Geneva*. 2017;92(38):557–72.
- Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018;2018(CI):1–12. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3296893/>
- Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol* [Internet]. 2012;28(12):531–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007>
- Brasil M da S. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2014. 120 p. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
- GHARBI M, MHADHBI M, REJEB A, JAOUADI K, ROUATBI M, DARGHOUTH MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Rev Sci Tech l'OIE* [Internet]. 2015;34(2):613–26. Available from: <http://doc.oie.int:8080/dyn/portal/index.seam?page=alo&aloId=33005>
- Soccol VT, Pasquali AKS, Pozzolo EM, De Souza Leandro A, Chiyo L, Baggio RA, et al. More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. *PLoS One*. 2017;12(12):1–18.
- Riboldi E, Carvalho F, Romão

- PRT, Barcellos RB, Bello GL, Ramos RR, et al. Molecular method confirms canine leishmania infection detected by serological methods in non-endemic area of Brazil. *Korean J Parasitol.* 2018;56(1):11–9.
12. Mota Herenio E, Fortes RC, Rincon G. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. *J Heal Sci Inst [Internet].* 2014 [cited 2018 Apr 16];32(2):126–9. Available from: https://www.unip.br/presencial/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2014/02_abr-jun/V32_n2_2014_p126a129.pdf
 13. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 1999;119(3):237–46.
 14. Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Filho JG, Perri SH V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol.* 2010;170(1–2):131–3.
 15. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol [Internet].* 2004;7(3):338–49. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&lng=pt&tlng=pt
 16. Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: Epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol.* 2009;20(5–6):471–89.
 17. Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, da Silva AC. Deception and manipulation: The arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front Immunol.* 2014;5(OCT):1–16.
 18. Pereira MA, Alexandre-Pires G, Câmara M, Santos M, Martins C, Rodrigues A, et al. Canine neutrophils cooperate with macrophages in the early stages of *Leishmania infantum* in vitro infection. *Parasite Immunol.* 2019;41(4):1–13.
 19. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-de-Souza MCA, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. *J Immunol.* 2004;172(7):4454–62.
 20. Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, Mitolo V, et al. Infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52(3):211–7.
 21. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2009;165(1–2):1–18.
 22. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008;158(4):274–87.
 23. Abass E, Bollig N, Reinhard K, Camara B, Mansour D, Visekruna A, et al. rKLO8, a Novel *Leishmania donovani* - Derived Recombinant Immunodominant Protein for Sensitive Detection of Visceral Leishmaniasis in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7).
 24. Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Testasica MCS, Lage DP, Costa LE, Lage PS, et al. Sensitive and specific serodiagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs by using peptides selected from hypothetical proteins
-

- identified by an immunoproteomic approach. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(6):931–44.
25. Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Costa LE, Garde E, Dimer LM, et al. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2016;115(4):1649–58.
 26. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006;81(1):68–75.
 27. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994;62(1):229–35.
 28. Duarte MC, Lage DP, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Menezes-Souza D, et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(4):398–407.
 29. De Freitas JCC, Nunes-Pinheiro DCS. Leishmanioses: Uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. *Acta Vet Bras.* 2013;7(3):193–204.
 30. Costa-Pereira C, Moreira ML, Soares RP, Marteleto BH, Ribeiro VM, França-Dias MH, et al. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res [Internet].* 2015;11(1):1–10. Available from: ???
 31. Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites and Vectors [Internet].* 2016;9(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1553-y>
 32. Schaut RG, Grinnage-Pulley TL, Esch KJ, Toepp AJ, Duthie MS, Howard RF, et al. Recovery of antigen-specific T cell responses from dogs infected with *Leishmania (L.) infantum* by use of vaccine associated TLR-agonist adjuvant. *Vaccine [Internet].* 2016;34(44):5225–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.016>
 33. Faldyna M, Levá L, Knötigová P, Toman M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - A flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;82(1–2):23–37.
 34. Trajano-Silva LAM. Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum*. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 2017.
 35. Diaz S, da Fonseca IP, Rodrigues A, Martins C, Cartaxeiro C, Silva MJ, et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. *Vet Parasitol.* 2012;189(2–4):137–44.
 36. Potestio M, Agostino PD, Romano GC, Milano S, Ferlazzo V, Aquino A, et al. CD4+ CCR5+ and CD4+ CCR3+ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in Patients With Acute Visceral Leishmaniasis. *Immunology.* 2004;113(2):260–8.
 37. Herath S, Kropf P, Müller I. Cross-talk between CD8+ and CD4+ T cells in experimental cutaneous
-

- leishmaniasis: CD8+ T cells are required for optimal IFN- γ production by CD4+ T cells. *Parasite Immunol.* 2003;25(11-12):559-67.
38. Viana AG, Magalhães LMD, Giunchetti RC, Dutra WO, Gollob KJ. Infection of human monocytes with *Leishmania infantum* strains induces a downmodulated response when compared with infection with *Leishmania braziliensis*. *Front Immunol.* 2018;8(DEC):1-12.
 39. Buurman WA, Vegt PA, Groenewegen G, Linden CJ v d, Jeunhomme GMAA. Analysis of buoyant density of canine peripheral blood leukocytes with PVP-Silica (Percoll) density gradients. *Vet Immunol Immunopathol.* 1982;3(6):547-56.
 40. De Bruin T, De Rooster H, Van Bree H, Cox E. The effect of different isolation procedures on canine leucocyte populations and on lectin-induced lymphocyte proliferation. *J Vet Med Ser A Physiol Pathol Clin Med.* 2005;52(9):460-5.
 41. Goddeeris BM, Morrison WI, Naessens J, Magondu JG. The bovine autologous mixed leukocyte reaction: A proliferative response of non-T cells under the control of monocytes. *Immunobiology* [Internet]. 1987;176(1-2):47-62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0171-2985\(87\)80099-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0171-2985(87)80099-2)
 42. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *J Clin Pathol - Mol Pathol.* 1999;52(4):189-96.
 43. Weiss JM, Renkl AC, Sleeman J, Dittmar H, Termeer CC, Taxis S, et al. CD44 Variant Isoforms are Essential for the Function of Epidermal Langerhans Cells and Dendritic Cells. *Cell Commun Adhes.* 1998;6(2-3):157-60.
 44. De Carvalho CM, Bonnefont-Rebeix C, Picandet S, Beraud J, Phothirath P, Chabanne L, et al. Evaluation of elutriation and magnetic microbead purification of canine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;101(3-4):171-8.
 45. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128(1-3):87-95.
 46. Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, Aguiar-Soares RD de O, et al. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine.* 2008;26(5):623-38.
 47. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2006;28(7):329-37.
 48. Gradoni L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Vet Parasitol* [Internet]. 2015;208(1-2):94-100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.003>
 49. Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol.* 2014;51(2):527-38.
 50. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, et al. TGF- β 1 Plays an Important Role in the Mechanism of CD4 + CD25 + Regulatory T Cell Activity in Both Humans and Mice . *J Immunol.* 2004;172(2):834-42.
 51. Maciel BLL, Valverde JG, Rodrigues-Neto JF, Freire-Neto F, Keesen TSL, Jeronimo SMB. Dual Immune modulatory effect of
-

- vitamin a in human visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2014;9(9).
52. Riondato F, Martini V, Poggi A, Rota A, Comazzi S, Sulce M, et al. Identification of a suitable internal control for fluorescence analysis on canine peripheral blood samples. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2016;172:38–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.03.007>
 53. Müller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J, Milon G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. *Int Immunol*. 1991;3(6):587–97.
 54. Rzepecka A, Żmigrodzka M, Witkowska-Piłaszewicz O, Cywińska A, Winnicka A. CD4 and MHCII phenotypic variability of peripheral blood monocytes in dogs. *PLoS One*. 2019;14(7):1–15.
 55. Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagnostic Investig*. 1997;9(4):439–40.
-

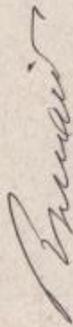
10. Anexo

Brasília, 12 de setembro de 2014.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “VALIDAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA **LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA E HUMANA**”, UnBDoC n.º 106668/2014, sob responsabilidade do Dr. Paulo Martins foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA



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



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