LUÍS FÁBIO DA SILVA BATISTA

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS ÀS IMUNIDADES
CELULAR, HUMORAL E AOS *STATUS* CLÍNICO E DE INFECÇÃO NATURAL PELA
Leishmania (Leishmania) infantum EM CÃES**

São Paulo

2016

LUÍS FÁBIO DA SILVA BATISTA

**Identificação de marcadores genéticos associados às imunidades celular, humoral e aos
status clínico e de infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti

De acordo:

Orientador

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3263
FMVZ

Batista, Luís Fábio da Silva

Identificação de marcadores genéticos associados às imunidades celular, humoral e aos *status* clínico e de infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães / Luís Fábio da Silva Batista. -- 2016.
175 p. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti.

1. GWAS. 2. Leishmaniose visceral canina. 3. Imunidade celular. 4. Imunidade humoral. 5. Progressão clínica da LVC. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação clínica, imunológica e suas correlações com marcadores genéticos na leishmaniose visceral canina", protocolado sob o nº 2391/2011, utilizando 100 (cem) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/4/2012.

We certify that the Research "Clinical and immunological evaluation and their correlation with genetic markers in canine visceral leishmaniasis", protocol number 2391/2011, utilizing 100 (one hundred) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/11/2012.

São Paulo, 12 de abril de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BATISTA, Luís Fábio da Silva

Título: Identificação de marcadores genéticos associados às imunidades celular, humoral e aos *status* clínico e de infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: 22/03/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Márcia Dalastra Laurenti

Instituição: FMUSP

Julgamento: Aprovado.

Prof. Dr. Paulo Maiorka

Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: Aprovado.

Prof. Dr. Claudia Momo

Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: Aprovado.

Prof. Dr. Nancy Starobinas

Instituição: Instituto Butantan

Julgamento: Aprovado.

Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

Instituição: HC-FMUSP

Julgamento: Aprovado.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho....

Aos meus pais Luiz e Marildes

Por todo amor, dedicação, preparo, incentivo, confiança, pelos exemplos de honestidade, dignidade e pela valorização da busca pelo conhecimento. Vocês foram fundamentais em cada etapa dessa conquista e a razão para nunca pensar em desistir.

Aos meus irmãos Manuela e Moisés, sobrinhos, primos, primas, tios e tias

Por todo incentivo, amizade, pelas boas energias, pelos exemplos de união, perseverança e pela torcida para que o sucesso dessa etapa fosse alcançado.

Ao companheiro Alberto Legutke

Pelas demonstrações incondicionais de dedicação, bondade, apoio em momentos decisivos, paciência, companheirismo, pelas ilustrações, por nunca desanimar, pela torcida e comemoração por cada etapa superada. Minha eterna gratidão e companheirismo...

Aos amigos Thaise, Carol, Maria José, Mighian, Hugo, Marivaldo, Sírío, Jaqueline, Deise, Alexandre, Raquel e Roberto

Pelos momentos de descontração, torcida, abrigo, aprendizado e ajuda em momentos decisivos. Vocês são diretamente responsáveis por eu ter sido feliz em SP. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Em memória do primo Renê Leandro

Pelo alto astral, pela bondade, pelos exemplos de honestidade, trabalho e amor à família. A sua vida é a maior razão para nunca me deixar abalar pelas injustiças. O aproveitamento da oportunidade de realizar esse trabalho é todo dedicado a você...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti

Por me aceitar como orientado, pela confiança, por acreditar em meu trabalho, pelo reconhecimento, pelo aprendizado, pela dedicação, busca incansável pelo aprimoramento, por ser exemplo de profissionalismo, honestidade, liderança e por promover um ambiente de trabalho acolhedor e estimulante. Sinto-me extremamente privilegiado por fazer parte da sua equipe e feliz pelo trabalho que realizamos.

À amiga e funcionária do LIM 50 da FMUSP, Thaíse Tomokane

Pelas instruções, dedicação, amizade, pelo acolhimento, pelas contribuições intelectuais e práticas na execução, análise e elaboração de todas as etapas. Sua participação foi fundamental nesse trabalho.

À bióloga Raíssa Dias e à mestranda Thais Bruna da Silva

Pela amizade, dedicação, assiduidade, contribuições técnicas e intelectuais e por aceitarem o desafio. Nada disso seria possível sem o trabalho de vocês.

Ao médico veterinário e doutorando Acácio Pacheco

Pela contribuição indispensável na avaliação clínica, coleta de material e apoio logístico. O seu trabalho foi fundamental.

Ao médico veterinário e doutorando Yuri Utsunomiya

Pela contribuição intelectual no estudo de associação genômica.

Aos amigos e colegas do LIM 50 - FMUSP Ana Carolina, Ana Kely, Bruno, Eduardo, Felipe, Fernanda, Jéssica, Mariana, Maria Fernanda, Thaise, Thays, Thaís Bruna e Raíssa

Pela amizade, pelo ambiente acolhedor, pelos momentos de descontração. Vocês fizeram eu me sentir em casa. Vocês moram em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Aos doutores do LIM 50 - FMUSP Carlos Corbett, Cláudia Gomes, Felipe Passero, Vânia da Matta e aos funcionários Edson Tadeu e Lia Negrão pelas contribuições intelectuais, dedicação e convívio agradável.

Aos pesquisadores Cáris Nunes, Fernando Garcia, Fernando Tobias, Mary Marcondes e Vânia da Matta. Suas contribuições foram fundamentais para o estudo.

Aos Médicos Veterinários Alexandre Lobo, Cláudio Rossi, Daniela Laranjeira, Fábio Nogueira, Fernanda, Ludmila Sobrinho, Márcio Moreira e equipe, Paulo Tabanês, Vitor Ribeiro e ao Prof. Carlos Eduardo Larsson pelo primor e apoio indispensável nas avaliações clínicas e coleta de material.

Aos pesquisadores Cáris Nunes, Mary Marcondes, Tereza Cristina da Silva, Patrícia Veras, Valéria da Silva e Roberto Meyer e às instituições Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Hospital Veterinário e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Hospital Veterinário da Universidade Anhembi – Morumbi por disponibilizarem suas estruturas clínicas e laboratoriais e permitir a realização de experimentos em campo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado e auxílio regular.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio ao projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado.

Aos funcionários da Deoxi Biotecnologia pela atenção e qualidade da genotipagem.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo por me aceitarem como doutorando e por toda assistência.

Aos professores do Departamento de Patologia da FMVZ – USP por propiciarem um ambiente estimulante de aprendizado e convívio amigável. Em especial a Lílian Sá e Paulo Maiorca por me aceitarem no Programa de Pós-graduação e no serviço de anatomia patológica na PP e PAE.

Aos colegas pós-graduandos do VPT em especial Marcos Santana, Paula Lima e Vanessa. Obrigado pela convivência.

Aos amigos Adam, André, Anirene, Dandara, Ludmila, Fernanda, Rafaela, Pier, Silvana e Tamiris do LBBM da FMVA – UNESP de Araçatuba. Gratidão pela acolhida e prestatividade.

Aos funcionários da Sessão de Pós-graduação da FMVZ – USP pela atenção e prestatividade e da Biblioteca da FMVZ – USP em especial a Elza Faquim pelo trabalho de normalização desse trabalho final.

Aos cães que são a razão da realização desse trabalho e a todos os proprietários por toda contribuição e paciência.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho, o meu agradecimento.

RESUMO

BATISTA, L.F.S. **Identificação de marcadores genéticos associados às imunidades celular, humoral e aos status clínico e de infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães.** [Identification of genetic markers associated to clinical, antibody and cell-mediated responses to natural *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs]. 2016. 177 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A infecção de cães pela *Leishmania (Leishmania) infantum* resulta em um espectro de manifestações imunopatológicas que dependem da interação parasito – hospedeiro e são definidas por fatores ambientais e pela genética do hospedeiro. Apesar disso, a imunogenética da leishmaniose visceral canina (LVC) permanece inexplorada. Nós realizamos diagnóstico laboratorial, clínico, ensaio de linfoproliferação (LPA), quantificação de citocinas, teste de hipersensibilidade tardia à leishmanina (LST), quantificação de IgA, IgE, IgG, IgM anti – *L. (L.) infantum*, IgG anti – saliva de flebotomíneo e genotipagem ampla afim de identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados aos diferentes perfis de imunidades celular, humoral, resposta clínica e status de infecção em cães de área endêmica, utilizando modelo de componente de variância (EMMAX). O efeito de estrutura da amostra foi controlado em todas as análises. A presença ou ausência de infecção pela *L. (L.) infantum* foi associado a regiões contendo os genes *PRGR_CANFA*, *RAB38*, *NOX4*, *PRKCI* e *SMAD7*, *IL1RA*, *IL12A_CANFA* relacionados à ativação de fagócitos, mecanismos microbicidas, sobrevivência intracelular de patógenos e resposta pró inflamatória; a resposta clínica foi associada a regiões contendo os genes *CATA_CANFA*, *LIAS*, *IL17A* e *IL17F* relacionados à proteção contra danos do estresse oxidativo e indução de resposta pró inflamatória; o resultado LST+ foi associado à resposta Th1, controle da infecção mas não preveniu a manifestação de sinais clínicos, enquanto o LST- foi associado à resposta Treg e aumento do parasitismo. O resultado do LST foi associado a regiões contendo os genes *MEP1B*, *PTPRM*, *TLN1*, *TGFBR1*, *ITGA9*, *EPCAM* e *CALM1* envolvidos com maturação de fagócitos, migração e adesão de leucócitos, estabilidade da sinapse imunológica, diferenciação e proliferação de linfócitos. A linfoproliferação foi dependente da carga parasitária e associada a regiões contendo os genes *FOCAD*, *PIAS2*, *SMAD2* e *IL6R* envolvidos com supressão tumoral e diferenciação de linfócitos Th17 ou Treg; o aumento dos níveis de IgA, IgE e IgG anti – *L. (L.) infantum* foi associado à LVC sintomática enquanto o de IgG anti – saliva de *Lutzomyia longipalpis* foi associado à exposição e infecção

assintomática. Quanto à resposta de IgM, foram identificados SNPs nos genes *NXN* e *SH3BP5* relacionados com inibição do crescimento, diferenciação e ativação de linfócitos B e vias de sinalização de TLR4 e TLR9; para IgG anti - *L. (L.) infantum* foram identificadas regiões contendo os genes *IL17RB*, *SH2B3* e replicação do *loci* de susceptibilidade *NOX4*, *RAB38*, *CTSC* envolvidos com linfopoiese, citocinese, resposta pró inflamatória, mecanismos microbicidas, sobrevivência intracelular de *Leishmania*; os níveis de IgA foram associados a regiões contendo os genes *LIN28A* e *MAFB* implicados na predisposição à nefropatia glomerular, já os níveis de IgG anti – saliva de *Lu. longipalpis* foram associados a regiões contendo os genes *ERBB2IP*, *CD180*, *RAB7A_CANFA*, *FOXP1*, *RUNX1*, *SOD1*, *Q3HTU8_CANFA*, *IFNAR1*, *IFNAR2* e *IFNGR2* envolvidos com supressão celular, produção de imunoglobulina via TLR4 e sobrevivência intracelular de *Leishmania*. Esses resultados apontam regiões cromossômicas úteis para a elucidação da resposta à infecção por *L. (L.) infantum* em cães e alvos potenciais para estudos funcionais, estratégias profiláticas e terapêuticas.

Palavras-chave: GWAS. Leishmaniose visceral canina. Imunidade celular. Imunidade humoral. Progressão clínica da LVC.

ABSTRACT

BATISTA, L.F.S. **Identification of genetic markers associated to clinical, antibody and cell-mediated responses to natural *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs.** [Identificação de marcadores genéticos associados às imunidades celular, humoral e aos status clínico e de infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães]. 2016. 177 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Leishmania (Leishmania) infantum infection in dogs leads to a range of immunopathological responses, which depend on a parasite - host interaction and are defined by environmental factors and genetic of host. Nevertheless, immunogenetic of the canine leishmaniasis (CanL) remains unexplored. We performed diagnosis and clinical evaluation, lymphoproliferation assay (LPA), leishmanin skin test (LST), quantification of cytokine, *anti-L. (L.) infantum* IgA, IgE, IgG, IgM, anti- sandfly saliva IgG levels and genome wide association scan of 110.165 SNPs (GWAS) in order to identify loci associated to clinical, antibody, cell-mediated responses and status of infection in 189 dogs, employing an expedited efficient mix model of association (EMMAX). Control of stratification effects due to sample structure was evidenced by the low inflation factors. Status of infection was associated to SNPs in linkage disequilibrium (LD) with *PRGR_CANFA*, *RAB38*, *NOX4*, *PRKCI* and in the neighborhood of *SMAD7*, *IL1RA*, *IL12A_CANFA* genes related to phagocyte maturation, killing of pathogens and proinflammatory response; clinical outcome was associated to *CATA_CANFA*, *LIAS*, *IL17A*, *IL17F* loci involved in prevention of oxidative burst – mediated injury and proinflammatory response; LST+ was associated to Th1 response although it has not prevented symptoms, whereas LST- was associated to Treg response and enhanced parasite load. Overall, LST response was associated to *MEP1B*, *PTPRM*, *TLN1*, *TGFBR1*, *ITGA9*, *EPCAM* e *CALM1* loci committed to phagocyte maturation, leukocyte adhesion and migration, stability in immunological synapse, lymphocyte differentiation and proliferation. Lymphocyte proliferation was rely on parasite burden and associated to *FOCAD*, *PIAS2* loci in the neighborhood of *SMAD2* e *IL6R* genes, which are implicated in tumor suppression and Treg/Th17 decision; Increased levels of *anti-L. (L.) infantum* IgA, IgE, IgG were observed in severity of CanL. In contrast, anti- sandfly saliva IgG was enhanced in asymptomatic dogs. IgM response was associated to *NXN* e *SH3BP5* loci related to fate, growing and activation of B cells; *anti-L. (L.) infantum* IgG levels was associated to region containing *IL17RB*, *SH2B3* and replication of *NOX4*, *RAB38*, *CTSC* susceptibility loci

involved in proinflammatory response, microbicidal activity, lymphopoiesis and cytokinesis; IgA levels were associated to SNPs on *LIN28A* and *MAFB*, which are implicated in glomerular nephropathy, whereas anti-sandfly saliva IgG levels were associated to *ERBB2IP*, *CD180*, *RAB7A_CANFA*, *FOXP1*, *RUNX1*, *SOD1*, *Q3HTU8_CANFA*, *IFNAR1*, *IFNAR2* e *IFNGR2* loci, which are related to suppression of inflammation, antibody response through the TLR4 pathway and survival of intracellular pathogens. These findings provide insights for responses to *L. (L.) infantum* infection and point to potential targets for functional investigations, therapeutic and prophylactic strategies.

Keywords: GWAS. Canine leishmaniasis. Cell-mediated response. Antibody response.

Clinical response for CanL.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	cão assintomático
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
APC	célula apresentadora de antígeno
BCR	receptor de célula B
<i>CALM2</i>	gene que codifica a calmodulina 2
<i>CATA_CANFA</i>	gene que codifica a enzima catalase em cães
CCL1	C-C quimiocina ligante 1
CCL16	C-C quimiocina ligante 16
<i>CD180</i>	gene que codifica o antígeno de superfície de linfócitos B, CD180
CTL	grupo controle – cães não infectados
<i>CTSC</i>	gene que codifica a peptidase Catepsina C
DLA	antígeno leucocitário canino (MHC)
ELISA	ensaio de imunoabsorbância ligada a enzima
EMMAX	modelo misto de associação eficientemente acelerada
<i>EPCAM</i>	gene que codifica a molécula de adesão de célula epitelial
<i>ERBB2IP</i>	gene que codifica a proteína Erbina adaptadora do receptor ERBB2
FcR	receptor de porção Fc de imunoglobulina
<i>FOCAD</i>	gene que codifica a proteína de adesão focal Focadesina
<i>FOXP1</i>	gene que codifica o regulador transcricional FoxP1
<i>GRM5</i>	gene que codifica o receptor de glutamato metabotrópico 5
GWAS	estudo amplo de associação genômica
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HGS	homogenato de glândula salivar
IgA	imunoglobulina A
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G

IgM	imunoglobulina M
IFN- γ	citocina interferon gama
IBS	matriz de identidade por estado
IL-1	interleucina 1
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-17	interleucina 17
IL-18	interleucina 18
<i>IL1RAP</i>	gene que codifica a proteína adaptadora do recptor da IL-1
<i>IL12A</i>	gene que codifica a IL-12A
<i>IL17A</i>	gene que codifica a IL-17A
<i>IL17F</i>	gene que codifica a IL-17F
<i>ITGA9</i>	gene que codifica a integrina $\alpha 9$
<i>IL6R</i>	gene que codifica o receptor da IL-6
<i>IL17RB</i>	gene que codifica o receptor B da IL-17
<i>IFNAR1</i>	gene que codifica o receptor 1 do IFN- α
<i>IFNAR2</i>	gene que codifica o receptor 2 do IFN- α
<i>IFNGR2</i>	gene que codifica o receptor 2 da IFN- γ
Leish	estímulo <i>ex vivo</i> com antígeno de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>
LFND	linfonodo
LV	leishmaniose visceral
LVC	leishmaniose visceral canina
LPA	ensaio de linfoproliferação
<i>LIAS</i>	gene que codifica o gene da enzima ácido lipóico sintetase
<i>LIN28A</i>	gene que codifica o gene regulador pós transcricional Lin28A
<i>MAFB</i>	gene que codifica o fator de transcrição MafB
<i>MEP1B</i>	gene que codifica a metaloproteinase Meprina - β

MHC	complexo de histocompatibilidade principal
NO	óxido nítrico
<i>NOX4</i>	gene que codifica a NADPH oxidase 4
<i>NXN</i>	gene que codifica a proteína nucleoredoxina
O ₂ ⁻	ânion superóxido
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PBS	tampão fosfato - salina
PCA	análise de componentes principais
PCR	reação em cadeia da polimerase
<i>PIAS2</i>	gene que codifica a proteína inibidora da STAT 2
<i>PRGR_CANFA</i>	gene que codifica a progesterona canina
<i>PRKCI</i>	gene que codifica a proteína quinase C Iota
<i>PTPRM</i>	gene que codifica o receptor μ da proteína tirosina fosfatase
<i>Q3HTU8_CANFA</i>	gene que codifica o receptor β da IL-10
<i>RAB38</i>	gene que codifica a Ras GTPase Rab38
<i>RAB7A_CANFA</i>	gene que codifica a Ras GTPase RAB7A canina
ROS	espécies reativas de oxigênio
<i>RUNX1</i>	gene que codifica o fator de transcrição 1 relacionado ao Runt (CBF)
SB	swab bucal
SC	swab de conjuntiva
SD	cão sintomático
<i>SH3BP5</i>	gene que codifica a proteína ligadora ao domínio SH3 da BTK
<i>SH2B3</i>	gene que codifica a proteína adaptadora 3 do SH2B
<i>SIAT8E</i>	gene que codifica o gene da Sialiltransferase 8
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
<i>SMAD2</i>	gene que codifica a proteína transdutora de sinal intracelular SMAD2
<i>SMAD7</i>	gene que codifica a proteína nuclear SMAD7
SOD	superóxido dismutase
TCR	receptor de linfócitos T

T_{FH}	linfócito T auxiliar folicular
TGF- β	fator de crescimento tumoral β
<i>TGFB1</i>	gene que codifica o receptor 1 do TGF- β
Th1	linfócito T auxiliar 1
Th2	linfócito T auxiliar 2
Th17	linfócito T auxiliar 17
<i>TLN1</i>	gene que codifica a proteína do citoesqueleto talina 1
TNF- α	tumor de necrose tumoral α
Treg	linfócito T regulatório
UE	unidade de ELISA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	25
2.2	A IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	27
2.3	BASE GENÉTICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL	34
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	DESENHO EXPERIMENTAL	43
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.1	ANIMAIS.....	45
5.2	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	45
5.3	PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA.....	46
5.4	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI- <i>L. (L.) infantum</i> E ANTI- <i>Lutzomyia longipalpis</i>	47
5.4.1	Produção de antígeno bruto de <i>L. (L.) infantum</i>	47
5.4.2	ELISA para detecção de imunoglobulinas anti- <i>L. (L.) infantum</i>	47
5.4.3	ELISA para detecção de IgG anti-saliva de flebotomíneo.....	48
5.5	AVALIAÇÃO CLÍNICA	49
5.6	TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA À LEISHMANINA (LST)	50
5.7	ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO (LPA)	50
5.8	PERFIS DE IMUNIDADE CELULAR	51
5.9	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	52
5.10	MENSURAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E SUPERÓXIDO DISMUTASE	52
5.11	GENOTIPAGEM E ANÁLISE DE ESTRUTURA DA AMOSTRA	52
5.12	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA (GWA)	53
5.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS FENOTÍPICOS	54
5.14	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	54
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55

6.1	AMOSTRAGEM E ESTRUTURA DA AMOSTRA	55
6.2	DIAGNÓSTICOS SOROLÓGICO E PARASITOLÓGICO	58
6.3	ASSOCIAÇÃO GENÔMICA À INFECÇÃO POR <i>L. (L.) infantum</i>	59
6.3.1	Associação genômica ao status de infecção	67
6.4	AVALIAÇÃO CLÍNICA	67
6.5	ASSOCIAÇÃO GENÔMICA À RESPOSTA CLÍNICA DA INFECÇÃO NATURAL PELA <i>L. (L.) infantum</i>	69
6.5.1	Associação genômica ao status clínico	69
6.5.2	Associação genômica à progressão clínica da LVC	74
6.6	AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR À INFECÇÃO NATURAL PELA <i>L. (L.) infantum</i>	78
6.6.1	Correlação parcial entre imunidade celular <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	78
6.6.2	Cães infectados naturalmente pela <i>L. (L.) infantum</i> respondem de 4 maneiras distintas ao LST e ao LPA	79
6.6.3	A proliferação de linfócitos é dependente da carga parasitária no linfonodo	82
6.6.4	O perfil de citocinas dos cães LST+/LPA+ foi predominantemente Th1 enquanto cães LST-/LPA+ apresentaram resposta mista entre Th1 e Treg/Th2	
	85	
6.6.5	O perfil LST-/LPA+ foi permissivo à replicação de <i>L. (L.) infantum</i>	88
6.6.6	Os perfis de imunidade celular foram clinicamente heterogêneos	89
6.7	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA À IMUNIDADE CELULAR.....	91
6.7.1	Associação genômica ao resultado no LST (qualitativo)	91
6.7.2	Associação genômica ao tamanho da área de induração no LST (quantitativo)	
	98	
6.7.3	Associação genômica ao resultado qualitativo do ensaio de proliferação (LPA)	100
6.7.4	Associação genômica ao índice de proliferação de PBMC	105
6.8	AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL À INFECÇÃO POR <i>L. (L.) infantum</i>	105
6.8.1	Resposta de IgM anti-<i>L. (L.) infantum</i>	105
6.8.2	Associação genômica à resposta de IgM anti-<i>L. (L.) infantum</i>	107
6.8.3	Resposta de IgG anti-<i>L. (L.) infantum</i>	111
6.8.4	Associação genômica à resposta de IgG anti-<i>L. (L.) infantum</i>	114

6.8.5	Resposta de IgA anti- <i>L. (L.) infantum</i>	119
6.8.6	Associação genômica à resposta de IgA anti- <i>L. (L.) infantum</i>	121
6.8.7	Resposta de IgE anti- <i>L. (L.) infantum</i>	124
6.8.8	Associação genômica à resposta de IgE anti- <i>L. (L.) infantum</i>	125
6.8.9	Resposta de IgG anti-saliva de flebotomíneo	126
6.8.10	Associação genômica à resposta de IgG anti-HGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	128
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	145
8	CONCLUSÕES.....	149
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151
10	ANEXOS.....	174

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as seis doenças tropicais de maior importância. Dentre as protozooses, perde apenas para a malária em número de novos casos. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que ocorrem 1,3 milhões de casos novos e cerca de 30.000 mortes anuais de vítimas da leishmaniose. O número de indivíduos infectados por *Leishmania*, ultrapassaria 12 milhões em todo mundo. O Brasil está entre os seis países que apresentam mais de dois terços da incidência mundial de leishmaniose tegumentar (LT) e entre os seis países que apresentam mais de 90% da incidência mundial de leishmaniose visceral (LV), onde o aumento da incidência nas últimas décadas se deu pelas mudanças ambientais como desflorestamento, urbanização e às condições de pobreza e malnutrição (WHO, 2015).

Os agentes etiológicos das leishmanioses são espécies de protozoários unicelulares, heteroxênicos do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae* e ordem *Kinetoplastida*. Esses parasitos apresentam duas formas de desenvolvimento, a amastigota, encontrada no interior de células de tecidos infectados em hospedeiros mamíferos e a promastigota, encontrada no tubo digestório de insetos da ordem *Diptera*, subfamília *Phlebotominae*. Os flebotomíneos transmitem *Leishmania* spp. entre animais silvestres e domésticos, sendo acidental a participação do homem no ciclo de transmissão (LAINSON; RANGEL, 2005; BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

No homem, a infecção por *Leishmania* spp. resulta em uma variedade de manifestações como infecções assintomáticas comuns à grande maioria dos casos, mas que podem eventualmente evoluir para manifestações sistêmicas e óbito consequente da LV que não é tratada, ou para lesões muco-cutâneas características da LT (WHO, 2010).

A LV ou calazar é causada por espécies do complexo *Leishmania donovani*. Em países do leste da África, na Índia e em partes do Oriente Médio, a *L. donovani* é mantida entre flebotomíneos e o homem em um ciclo de transmissão antroponótico. Já nos países da Europa, norte da África, América do Sul e América Central, *Leishmania (Leishmania) infantum* [sin. *Leishmania (Leishmania) chagasi*] causa LV e é mantida em ciclo zoonótico de transmissão que conta com a participação do homem e de espécies de animais domésticos e silvestres (ALVAR et al., 2012).

Os cães que vivem em áreas endêmicas representam o principal reservatório da *L. (L.) infantum* uma vez que a prevalência de infecção na população canina é alta e que a presença de cães em moradias de áreas endêmicas constitui um fator de risco importante para a infecção de indivíduos pela *L. (L.) infantum* (COURTENAY et al., 2002; BELO et al., 2013; LAURENTI et al., 2013). Apesar de coabitarem o mesmo ambiente, humanos e caninos divergem quanto à resposta à infecção, por consequência, a leishmaniose manifestada no cão guarda propriedades epidemiológicas e imunopatológicas peculiares e distintas da doença manifestada no homem. Enquanto a prevalência de infecção na população humana é de 24% com desenvolvimento de LV sintomática em apenas 5% dos indivíduos, a prevalência de infecção na população canina varia entre 60 a 80% (SILVEIRA et al., 2009; COURA-VITAL, 2011; DA COSTA et al., 2015). A partir do momento em que os cães são expostos ao parasito, um espectro de alterações clínicas e imunopatológicas pode ocorrer. Essas alterações incluem desde a eliminação do parasito na fase inicial, manutenção de infecção assintomática, doença branda ou a leishmaniose visceral canina (LVC) severa (PALTRINIERI et al., 2010).

O resultado da infecção por *L. (L.) infantum* depende de fatores ambientais, como o grau de exposição ao flebotomíneo, da virulência do parasito, da interação entre o parasito e o hospedeiro e da habilidade de resposta imune do hospedeiro em controlar a infecção sem causar doença (BUCHETON et al., 2002; MANZILLO et al., 2006; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; DA COSTA et al., 2015). A presença do parasito em tecidos periféricos induz uma resposta inflamatória mediada pela imunidade inata e desencadeia intensa proliferação clonal de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ capazes de reconhecer antígenos na superfície de células apresentadoras de antígeno (APC) e de linfócitos B que internalizam antígenos presentes no meio extracelular. O controle da infecção é associado à diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em subpopulações Th1 produtores de IL-2, IFN- γ , TNF- α (BARBIERI, 2006) e Th17 produtores de IL-17 e IL-22 (NASCIMENTO et al., 2015a). Essas citocinas ativam células teciduais e fagócitos atraídos ao sítio de infecção. Consequentemente, fagócitos são estimulados a produzir óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases lisossomais que levam à eliminação de parasitos internalizados. No entanto, quando a resposta pró inflamatória é excessivamente ativada, pode causar danos à célula hospedeira, morte celular, intensificação da inflamação, alterações histopatológicas e macroscópicas (HEIDARPOUR et al., 2012; SILVA et al., 2013). A intensidade da resposta pró inflamatória é regulada por TGF- β produzido pelas células T regulatórias (Treg) e principalmente por IL-10, liberada por células Treg, Th2 ou pelas

próprias células Th1 e Th17 excessivamente ativadas (MURPHY, 2012). A resposta Treg é antagônica à resposta Th1 por inibir as funções efetoras de fagócitos e evitar os danos teciduais. Por outro lado, a resposta regulatória é permissiva à proliferação da *L. (L.) infantum*. O papel da resposta imune na LVC pode ser definido pelo equilíbrio entre as respostas Th1/Th17 e Treg/ Th2 (SANCHEZ-ROBERT et al., 2008a; CORTESE et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2014; SOUZA et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2015a).

Uma grande parcela da patogenia da LVC é atribuída à intensa ativação da produção de anticorpos específicos e inespecíficos por linfócitos B. As imunoglobulinas não são úteis para a eliminação da *L. (L.) infantum*, ao contrário disso, elas precipitam-se na forma de complexos imunes ou reagem contra tecidos próprios e provocam prejuízo ao funcionamento normal de determinados órgãos. A expansão de linfócitos B e plasmócitos produtores das quatro classes de imunoglobulinas sugere a influência de linfócitos Th1 e Th2 na indução da imunidade humoral contra a *L. (L.) infantum* em cães (BRACHELENTE et al., 2005; BANETH et al., 2008; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014). Em geral, cães infectados assintomáticos mantêm uma carga parasitária baixa e podem apresentar ou não resultado positivo no teste da leishmanina (LST); enquanto cães doentes apresentam desde sintomas brandos até sintomas severos associados à supressão da resposta de linfócitos T e altos níveis de imunoglobulinas (PINELLI et al., 1995; SOLANO-GALLEGO et al., 2000; BOGGIATTO et al., 2010).

Até o presente momento, não há no Brasil registro de fármaco para o tratamento específico da LVC. Como agravante, as abordagens quimioterápicas e imunoterápicas disponíveis não promovem a cura parasitológica. Portanto, cães tratados permanecem servindo de fonte de infecção para o vetor (MANNA et al., 2008; MIRET et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Embora seja possível dispor do conhecimento acumulado ao longo de décadas no estudo da infecção natural pela *L. (L.) infantum*, algumas questões permanecem ocultas como as divergências clínico-imunopatológicas observadas em cães submetidos ao mesmo estilo de vida. Essas observações empíricas somadas a achados experimentais como a associação de perfil de resistência a determinadas raças e às evidências recentes de associação de genes envolvidos na resposta imune sustentam a ideia de que a base genética tem uma relevância notável no resultado da infecção por *L. (L.) infantum* em cães (SOLANO-GALLEGO et al., 2000; ALTET et al., 2002; QUINNELL et al., 2003b; UTSUNOMIYA et al., 2015).

A identificação de marcadores em regiões cromossômicas associadas aos diferentes perfis de resposta clínica e imunológica à infecção por *L. (L.) infantum* pode melhorar a compreensão do espectro de manifestações observadas em cães que vivem em área endêmica e abrir perspectivas de novos alvos terapêuticos específicos para cães.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A *L. (L.) infantum* é encontrada nas formas promastigota e paramastigota, no trato digestório dos hospedeiros invertebrados, e na forma amastigota, sem flagelo livre, parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

Trata-se de uma doença complexa, cujo ciclo biológico se inicia quando as amastigotas presentes na pele ou no sangue periférico de hospedeiros mamíferos são ingeridas durante o repasto sanguíneo e transformam-se em promastigotas no trato digestório do vetor *Lutzomyia longipalpis*. Durante a metaciclogênese, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se e migram para o tubo digestório anterior do inseto. O ciclo se completa quando promastigotas são inoculadas na pele de outro hospedeiro mamífero pela picada da fêmea de flebotomíneo. Uma vez inoculadas, as promastigotas são internalizadas por células fagocíticas residentes da pele do hospedeiro, como células dendríticas e macrófagos ou células recrutadas no momento da picada, como neutrófilos e macrófagos. No interior desses fagócitos, as promastigotas transformam-se em amastigotas e circulam através da corrente sanguínea ou vasos linfáticos até alcançar órgãos como linfonodos, fígado, baço, medula óssea, rins, intestino e pulmões. A intensa proliferação das amastigotas dentro de macrófagos favorece o rompimento da membrana celular e a liberação de parasitos, que infectam rapidamente outros macrófagos (SOARES et al., 2002; ALVAR et al., 2004).

As formas amastigotas podem ser visualizadas em cortes histológicos dos órgãos infectados corados pelos métodos de coloração de rotina (HE), imunomarcadas, como no método da imunohistoquímica (IHQ) ou em exames de punção aspirativa, coradas pelos métodos empregados em esfregaço sanguíneo (BRASIL, 2006; ROSSI, 2013). Apesar da alta especificidade, essas técnicas de exame parasitológico direto apresentam sensibilidade aquém das que são obtidas em técnicas de biologia molecular (NUNES et al., 2015) que são

capazes de identificar DNA até mesmo de um único parasito (FRANCINO et al., 2006). Estudos que utilizaram a reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstraram que a prevalência de cães de área endêmica infectados por *L. (L.) infantum* varia entre 60% e 80%. Em comparação com outros tipos de amostra que podem ser usadas na PCR, a biópsia aspirativa de linfonodo demonstrou sensibilidade alta, sobretudo quando foi combinada com amostras não invasivas como swab oral e de conjuntiva. Apesar da alta prevalência da infecção, apenas uma parte dos cães apresenta doença clínica aparente (SOLANO-GALLEGO et al., 2001a; LEONTIDES et al., 2002; LOMBARDO et al., 2012; SOLCÀ et al., 2014).

De acordo com o estadiamento criado para orientar a conduta clínica, os cães de área endêmica podem eliminar o parasito na fase inicial, manter uma infecção assintomática, evoluir para doença branda ou manifestar LVC severa (PALTRINIERI et al., 2010). Cães que apresentam doença, manifestam diferentes sinais clínicos e graus de severidade variáveis. Os achados clínicos e suas respectivas frequências em animais com LVC sintomática são os seguintes: dermatites esfoliativa, ulcerativa, nodular e pustular (81%-89%), linfadenomegalia (62%-90%), alterações oculares como uveíte, conjuntivite, ceratoconjuntivite seca e blefarite (16%-81%), palidez de membranas mucosas (58%), esplenomegalia (10%-53%), caquexia (10%-48%), febre (4%-36%), epistaxe, diarreia (6%-10%) e onicogribose (20-31%). Além disso, observa-se doença renal caracterizada por proteinúria, insuficiência renal crônica, glomerulonefrite, nefrite túbulo-intersticial e amiloidose; alterações ósseas como osteopenia; articulares como poliartrite; vasculares como vasculite, hematológicas e bioquímicas (BANETH et al., 2008; CASTRO; VINICIUS; SOUSA, 2012; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

As alterações histopatológicas encontradas nos órgãos atingidos são associadas à presença do parasito ou imunomediadas. O achado mais comum é a presença de infiltrado inflamatório crônico composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos isolados. Na pele, observa-se infiltrado inflamatório crônico difuso na derme papilar e focal na derme reticular acompanhados de hiperqueratose, acantose, paraqueratose, edema intercelular e degeneração hidrópica na epiderme, sendo algumas dessas alterações presentes inclusive em animais assintomáticos. Por ser frequente a observação de intenso infiltrado inflamatório com baixo parasitismo, a intensidade da inflamação é fracamente correlacionada com o parasitismo (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2010).

Nos linfonodos, observa-se linfadenite capsular, inflamação da zona subcapsular, hipertrofia e hiperplasia de nódulos linfáticos e de macrófagos, congestão, hemossiderose e

parasitismo intenso. O baço apresenta espessamento e inflamação da cápsula, hipertrofia e hiperplasia das polpas branca e vermelha, depleção de zonas de linfócitos T, granulomas, congestão, hemosiderose e parasitismo intenso. As alterações hepáticas são degeneração hidrópica e esteatose, inflamação crônica da cápsula de Glisson e do espaço porta, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, granuloma intralobular, hemosiderose, congestão sinusoidal e parasitismo intenso. Os rins são afetados com glomerulonefrite membranoproliferativa, nefrite intersticial, fibrose e atrofia glomerular, hemosiderose e parasitismo. Nos pulmões ocorrem pneumonite difusa crônica, espessamento do septo alveolar e parasitismo. Além do parasitismo, uma alteração comum entre os órgãos é um quadro de fibrose intensa resultante da cronificação do processo inflamatório (SILVA et al., 2013).

Além do quadro fibrótico decorrente da exacerbação dos processos inflamatórios, as alterações vasculares e trombocitopenia mediadas por autoanticorpos e a deposição de complexos de anticorpos específicos e inespecíficos como parte da patogênese das nefropatias reforçam a ideia de que a LVC é uma doença imunomediada pelo excesso de imunoestimulação (NIETO et al., 1992; GINEL; CAMACHO; LUCENA, 2008; CORTESE et al., 2009; SOARES; MORAES; MORAES, 2009; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

2.2 A IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O conjunto de alterações sucessivas à infecção por *L. (L.) infantum* é definido essencialmente pela interação entre o parasito e a resposta imune do cão. Desse modo, os desempenhos dos aparatos naturais e mecanismos adaptados ao microrganismo invasor constituem o cerne entre o êxito e o fracasso da tentativa de eliminar o patógeno sem causar malefício.

A imunoativação adequada ocorre quando parasitos inoculados na pele do cão provocam o desencadeamento de um processo inflamatório que é em seguida amplificado pela cascata do sistema complemento ou por cadeias de sinalização deflagradas pelos receptores do tipo toll (TLR) (REIS E SOUSA; SHER; KAYE, 1999; SACRAMENTO et al., 2014). O teor de quimiocinas e citocinas pró inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β e IL-6 proporcionado por

neutrófilos, macrófagos, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, presentes no tecido invadido, favorecem o recrutamento e maturação de fagócitos como macrófagos e células dendríticas que fagocitam *Leishmania* e adquirem características de células apresentadoras de antígeno (APC). Além de serem induzidas a produzir IL-12, IL-6, IL-18 e TNF- α (BUCKLEY et al., 2001; STRAUSS-AYALI; BANETH; JAFFE, 2007; MORAVEJ et al., 2012; LI et al., 2014; HOSEIN et al., 2015), APCs ativadas tornam-se aptas a ativar células T imaturas, já que passam a expressar moléculas de MHC e moléculas coestimulatórias em suas superfícies (SACCHI et al., 2006). Essas células processam antígenos de *Leishmania* e os apresentam ligados às moléculas de MHC II aos linfócitos TCD4⁺ e às moléculas de MHC I aos linfócitos TCD8⁺.

Quando o complexo do receptor de antígeno dos linfócitos T (TCR) imaturos reconhece antígenos no MHC, esses linfócitos podem ser ativados, caso haja ligação recíproca de moléculas coestimulatórias, como B7:CD28 responsáveis pelos sinais de sobrevivência e expansão dos clones de linfócitos efetores (IL-2). A falta de coestimulação no contato entre APC e células T imaturas pode render células T anérgicas não responsivas ao contato posterior com outra APC. A supressão de células T é uma característica dos estágios iniciais e dos estágios avançados da infecção por *L. (L.) infantum* em cães (JENKINS; MILLER, 1992; DE LUNA et al., 1999; PINELLI et al., 1999; BOGGIATTO et al., 2010). Em contraste, a ativação de células T de memória quiescentes é menos restrigente e pode ocorrer até mesmo sem coestimulação (JENKINS; MILLER, 1992; MURPHY, 2012).

A ativação de células T pode ocorrer no sítio de infecção ou em órgãos linfóides secundários como linfonodos e placas de Peyer. O contato inicial entre células T e APC, também conhecido como sinapse imunológica (SI), se inicia pela ligação inespecífica de moléculas de adesão célula a célula, tais como LFA-1:ICAM-1. A afinidade entre LFA-1 e ICAM-1 ou ICAM-2 é aumentada pelo reconhecimento do antígeno pelo TCR, o que garante o contato entre APC e células T por tempo suficiente para que citocinas liberadas pela APC influenciem a diferenciação da célula T e para que a célula T libere suas moléculas efectoras em direção a APC (DUSTIN, 2008).

Para que seja efetiva, a resposta imune celular requer um processo dinâmico de migração de fagócitos do tecido invadido em direção aos órgãos linfóides secundários e de linfócitos no sentido inverso. Esse dinamismo é provido por um conjunto amplo de moléculas de adesão e quimiocinas expressas nos tecidos infectados, nos órgãos linfóides e nos

leucócitos que são então atraídos para esses tecidos (HOGG et al., 2002; VON ANDRIAN; MEMPEL, 2003).

O resultado do contato entre APC e células T é a expansão e diferenciação de clones de células T efetoras engajadas com as respostas Th1, Th2, Treg ou Th17, por um processo que sofre influencia do contexto de citocinas presentes no momento da ativação da célula T. A IL-12 e a IL-18 induzem a diferenciação de Th1; a IL-1 β juntamente com IL-6 e TGF- β induzem a diferenciação de Th17, porém o TGF- β sozinho induz a diferenciação de linfócitos Treg e a IL-4 induz a diferenciação de Th2 (MURPHY; REINER, 2002; LITTMAN; RUDENSKY, 2010).

A imunidade que controla a infecção depende da predominância das respostas Th1 e Th17. As células Th17 produzem IL-17A, IL-17F, IL-22 e induzem uma forte resposta pró inflamatória nos momentos iniciais da infecção por ativar células teciduais como as células epiteliais, endoteliais e fibroblastos que por sua vez recrutam neutrófilos para o local da infecção. A expressão de IL-17 foi recentemente associada à proteção na fase inicial da infecção de cão por *L. (L.) infantum* (HOSEIN et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015a), assim como IL-17 e IL-22 cooperaram com a resposta Th1 na proteção do homem contra a LV causada pela *L. donovani* (PITTA et al., 2009).

Os clones de Th1 produzem IFN- γ e TNF- α . Essas citocinas são indutoras potentes de inflamação pois recrutam macrófagos para o sítio de infecção e os induzem a produzir citocinas pró inflamatórias (IL-12, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-18) (ETTINGER; WILSON, 2008), além de ativar os seus mecanismos leishmanicidas, tais como proteases lisossomais, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) como o ânion superóxido (O $_2^-$) e o peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$). O aumento do nível de NO associado ao aumento dos níveis de IFN- γ após a infecção e o aumento da infecção em macrófago após o bloqueio da produção de NO indicam que esse metabólito é usado por macrófagos para eliminar *L. (L.) infantum* internalizada (RODRIGUES et al., 2007; SOUZA et al., 2014). Por outro lado, a *L. (L.) infantum* consegue estabelecer infecção inibindo profundamente a produção de O $_2^-$ e H $_2$ O $_2$ (BRANDONISIO et al., 1996), o que evidencia a contribuição dessas metabólitos para a morte intracelular da *L. (L.) infantum*. Os metabólitos supracitados são tóxicos ao parasito, mas também são tóxicos ao hospedeiro quando são secretados no meio extracelular. Efeitos danosos de radicais oxidativos a cães infectados pela *L. (L.) infantum* foram demonstrados por HEIDARPOUR et al., 2012; SOUZA et al., 2014 que descreveram o prejuízo das funções renal e hepática e alterações histopatológicas no fígado, baço e linfonodo correlacionados com a

diminuição dos níveis das enzimas antioxidantes catalase e glutatona peroxidase e com o aumento da peroxidação lipídica que é causada principalmente pelo peroxinitrito. Essas enzimas antioxidantes convertem H_2O_2 em oxigênio e água. Já o H_2O_2 é um produto da ação da superóxido dismutase (SOD) sobre o O_2^- produzido pelo complexo NADPH oxidase. O complexo NADPH oxidase é polimerizado na membrana do fagossomo quando o patógeno é fagocitado (KUMAR et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1 – Balanço das atividades de enzimas oxidativas e antioxidativas para eliminar *Leishmania* sp. internalizadas sem causar danos em fagócitos

Alguns relatos sustentam a ideia de que a *L. (L.) infantum* evade ao aparato microbicida do macrófago fazendo uma internalização “silenciosa” através dos receptores CR3, suprimindo funções efetoras dos macrófagos, evitando a interação entre o macrófago e o linfócito ou exaurindo os linfócitos T (DE LUNA et al., 1999; ETTINGER; WILSON, 2008; UENO

et al., 2009; ESCH et al., 2013; HOSEIN et al., 2015). Além disso, a *L. (L.) infantum* parece se beneficiar das propriedades anti hemostáticas e supressoras da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (KAMHAWI, 2000; ROHOUSOVA; LIPOLDOVA; VOLF, 2005).

Concomitante ao aumento da resposta Th1, ocorre o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. A IL-10 é produzida por linfócitos Th2 e pelos linfócitos Treg que também produzem TGF- β . Juntos, IL-10 e TGF- β suprimem as funções efetoras dos macrófagos e mimizam os danos celulares e teciduais mediados pelo excesso de estímulos pró inflamatórios (LITTMAN; RUDENSKY, 2010). Apesar de ser essencial para a homeostasia, a ação anti-inflamatória da IL-10 tem o efeito indesejado de inibir os mecanismos microbicidas dos macrófagos e de permitir a replicação dos parasitos internalizados. A resposta Th1 é intensamente regulada pela IL-10 e pelos linfócitos Treg em cães infectados pela *L. (L.) infantum*, assim como o aumento de IL-10 é associado também com o aumento da carga parasitária (ALVES et al., 2009; MENEZES-SOUZA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2013).

A LVC sintomática é caracterizada por uma hipergamaglobulinemia resultante da ativação policlonal de linfócitos B. Após a infecção, ocorre o aumento progressivo dos níveis de IgG total, IgA, IgE, e das subclasses IgG1 e IgG2, desde a fase aguda (NIETO et al., 1999; QUINNELL et al., 2003a; INIESTA; GÁLLEGO; PORTÚS, 2005; DE FREITAS et al., 2012). Por essa peculiaridade, o nível das imunoglobulinas está implicado diretamente no diagnóstico de alta sensibilidade, prognóstico e monitoramento clínico da LVC (PALTRINIERI et al., 2010; SOLCÀ et al., 2014).

Todos os linfócitos B maduros virgens apresentam na superfície, moléculas de IgD e IgM que funcionam como receptores de antígeno e são capazes de reconhecer parasitos presentes no meio extracelular, opsonizadas ou não pela proteína C3b do sistema complemento. Os receptores de linfócitos B (BCR) apresentam uma porção extracelular (imunoglobulina), uma porção transmembrana e uma porção intracelular acoplada a um complexo multiproteico de coreceptores que convertem o sinal extracelular sofrendo fosforilação e deflagrando uma cascata de sinalização que pode culminar na ativação do linfócito B. Em contrapartida, as fosfatases são capazes de desfosforilar proteínas acessórias e então desligar a cascata de sinalização. Uma outra classe de proteínas, as proteínas adaptadoras são capazes de ligar mais de uma proteína sinalizadora ao mesmo tempo e assim ligar ou desligar a sinalização. Os receptores FcR presentes em células dendríticas, macrófagos e podócitos, muitos receptores de citocinas e o TCR apresentam estrutura semelhante à do

BCR. O linfócito B que é ativado pode apresentar antígenos aos linfócitos T auxiliares específicos, cujas citocinas liberadas determinam a troca de classe de imunoglobulina e a diferenciação do linfócito B em plasmócito produtor de anticorpos (AKILESH et al., 2008; MURPHY, 2012).

A exceção da IgG2, o aumento das imunoglobulinas é correlacionado com o aumento da carga parasitária na LVC (QUINNELL et al., 2003a; GIUNCHETTI et al., 2006). Apesar disso, as imunoglobulinas não conseguem eliminar *Leishmania*. Curiosamente, a função da imunidade humoral nas leishmanioses não é bem definida. A resposta para essa questão pode estar na porção Fc das imunoglobulinas que pode ter função pró inflamatória, anti-inflamatória ou imunomoduladora a depender da sua sequência de aminoácidos, da subclasse, e do seu padrão de glicosilação (PINCETIC et al., 2014). Recentemente foi demonstrado que a severidade da LV em humanos foi associada a alterações profundas no padrão de glicosilação da porção Fc da IgG em relação a indivíduos assintomáticos, não infectados ou tratados (GARDINASSI et al., 2014).

Divergente da visão polarizada aceita anteriormente, o papel da imunidade na infecção por *L. (L.) infantum* em cães pode ser definido pela ativação adequada da imunidade inata e pelo equilíbrio das respostas adaptativas Th1/Th17 e Th2/Threg, capaz de controlar a infecção sem causar adversidades ao estado de homeostasia (**Figura 2**).

Figura 2 – Papel da imunidade adaptativa na leishmaniose visceral canina

Fonte: (BANETH et al., 2008).

Como resultado natural desse equilíbrio tem-se um espectro de manifestações imunopatológicas do qual são assumidos dois perfis extremos. O cão clinicamente sadio que mantém o controle da infecção, podendo apresentar ou não resultado positivo no teste da leishmanina (LST) e forte resposta proliferativa de linfócitos T. Já no extremo oposto, cães que desenvolvem doença severa apresentam altos níveis séricos de imunoglobulinas correlacionados com alta carga parasitária, supressão da resposta de linfócitos T e resultado negativo no LST (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007a; BANETH et al., 2008; PANARO et al., 2009; MENEZES-SOUZA et al., 2011).

O LST, também chamado de resposta de hipersensibilidade tardia (DTH), consiste em uma reação que ocorre entre 48 e 72 horas após a inoculação intradérmica de antígeno e é caracterizada por uma lesão eritematosa e/ou nodular (**ANEXO B**) resultante da presença de infiltrado inflamatório crônico na derme papilar e focal na derme reticular, composto principalmente por macrófagos e linfócitos dispersos (CARDOSO et al., 1998; SACCHI et al., 2006; PINHEIRO et al., 2009). O LST é um marcador de imunidade celular efetiva frequentemente associado à infecção assintomática, entretanto, vem sendo descrita em alguns animais doentes (PINELLI et al., 1994; DOS-SANTOS et al., 2008; SILVEIRA et al., 2012). Diante dessa diversidade de resposta, uma investigação aprofundada se faz necessária para

elucidar os fatores envolvidos na imunidade que é desencadeada em cães infectados pela *L. (L.) infantum*.

2.3 BASE GENÉTICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Os primeiros relatos sobre a base genética da LV datam da década de 70, quando (BRADLEY; KIRKLEY, 1977) designaram status de resistência e susceptibilidade por avaliação da carga parasitária no fígado de camundongos durante a fase aguda da infecção por *L. donovani*. Eles observaram uma ampla variação da carga parasitária entre as diferentes linhagens até 20 dias após a infecção, mas não entre indivíduos da mesma linhagem. No mesmo ano, BRADLEY (1977) realizou cruzamentos e retrocruzamentos entre camundongos resistentes e susceptíveis e observou que a transmissão da susceptibilidade à *L. donovani* à prole seguia um padrão de herança monogênica que não foi alterada após mudanças ambientais. Mais tarde, o mesmo grupo mapeou o gene *Leish* no cromossomo 1 de camundongo (BRADLEY et al., 1979). Outros autores observaram que a resistência natural de murinos à *Salmonella typhimurium* e à *Mycobacterium bovis*, ambos parasitos que se multiplicam no interior de macrófagos, era atribuída ao mesmo gene ou a genes em desequilíbrio de ligação no cromossomo 1 (PLANT; GLYNN, 1979; SKAMENE et al., 1982). Posteriormente, já na década de 90, o loci *Bcg/Lsh/Ity* foi clonado, caracterizado e denominado *NRAMP1* (VIDAL et al., 1993, 1995).

O *NRAMP1* codifica a proteína de resistência natural associada a macrófago, posteriormente chamada de proteína transportadora de soluto (Slc11a1). Essa proteína está localizada em compartimentos endossomais tardios de fagócitos como macrófagos, células dendríticas e polimorfonucleares e é prontamente deslocada para a membrana do fagolisossomo durante a fagocitose. O *NRAMP1* funciona como uma bomba para o efluxo de metais divalentes do fagossomo para o citossol, principalmente de ferro, manganês e zinco. A função exata do *NRAMP1* no controle da infecção de parasitos intracelulares não é bem conhecida, embora existam relatos de que a Slc11a1 exerce efeitos pleiotrópicos na ativação do fagócito que inclui regulação de quimiocina, TNF- α e IL-1 β , MHC classe II, NO, iNOS, explosão respiratória e fluxo de L-arginina. Coerente com essas observações, foi descoberta

uma mutação natural Gly → Asp no *NRAMP1* que torna camundongos susceptíveis à *L. donovani* (FORBES; GROS, 2001; BLACKWELL et al., 2011).

Sabe-se que os íons bombeados pela Slc11a1 servem como cofatores na atividade de inúmeras enzimas, tais como metaloproteinases, SOD e NOS, além disso, a reação de Fenton pode usar Fe^{+2} para gerar radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$). Os radicais gerados podem estar envolvidos tanto com a atividade microbicida da Slc11a1 quanto podem reagir entre si e formar peroxinitrito que consiste no radical mais reativo e tóxico tanto para o parasito como para o hospedeiro. Esse pode ser inclusive o mecanismo pelo qual o Slc11a1 está envolvido com processos patológicos imunomediados em doenças humanas autoimunes como artrite reumatoide e infecciosas como tuberculose pulmonar, hanseníase e LV (BLACKWELL et al., 2003).

A associação entre polimorfismos no gene *NRAMP1* e susceptibilidade foi descrita na LV em humanos (BUCHETON et al., 2003) e cães (ALTET et al., 2002). O gene *NRAMP1* canino localiza-se no cromossomo 37, em loci que foram os alvos dos estudos de ALTET et al., 2002 e SANCHEZ-ROBERT et al., 2005, 2008b. Esses pesquisadores identificaram polimorfismos na região promotora, em região de microssatélite do íntron 1 e mais 3 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) associados ao risco de desenvolvimento da LVC em estudos de caso-controle com cães de raças variadas e perfis de susceptibilidade determinados por avaliações clínicas e provas de imunidade. Em um dos três estudos desse grupo, seis haplótipos no *NRAMP1* foram declarados exclusivos da raça Ibizan hound (SANCHEZ-ROBERT et al., 2008b), tida como resistente à LVC por apresentar forte resposta celular específica (SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Os mesmos marcadores foram avaliados em população de cães mestiços de Araçatuba – SP, distribuídos em grupos de cães com resultados positivos ou negativos no diagnóstico para LVC (RIBEIRO, 2011). As associações identificadas nesse estudo mostraram-se discordantes das associações descritas por ALTET et al., 2002 e SANCHEZ-ROBERT et al., 2005, 2008b. Tais discordâncias foram atribuídas às diferenças na estrutura das amostras e nos desenhos experimentais dos estudos. Em um segundo estudo no Brasil, a expressão de RNAm de Slc11a1 foi avaliada entre cães naturalmente infectados de Belo Horizonte – MG que apresentaram perfis de resistência e susceptibilidade. Surpreendentemente, não foi observada diferença da expressão de Slc11a1 entre os grupos (BUENO et al., 2009), ou seja, os polimorfismos observados em nível genômico não foram confirmados em nível

transcricional, assim como variantes no *NRAMP1* não têm sido detectados em estudos de genotipagem ampla.

Além dos achados supracitados, a observação de que o aumento do risco relativo de se contrair LV em humanos se dá em agregados familiares (CABELLO et al., 1995; PEACOCK et al., 2001) constitui evidência adicional da participação da genética do hospedeiro no resultado da LV. Nesses estudos, foi admitida a possibilidade de modelo de herança multifatorial e poligênica da LV, embora a hipótese de único gene (Mendeliana) não fosse recusada (FEITOSA et al., 1999; PEACOCK et al., 2001). Esses achados inspiraram muitos estudos que adotaram abordagens tradicionais de análise genética de doenças complexas como teste de associação alélica em genes ou haplótipos candidatos e testes de ligação com o objetivo de identificar novos loci de susceptibilidade. Essas últimas abordagens baseiam-se em eventos de recombinação genética em famílias e mapeiam genes de susceptibilidade a LV em intervalos de 10 a 20 centiMorgans ou 10 a 20 Mb. Em análise de ligação, todos os membros dos multicasos familiares são genotipados para marcadores de microssatélite altamente polimórficos ao longo do genoma, numa abordagem chamada de rastreamento amplo de ligação genômica (GWLS) (DAWN TEARE; BARRETT, 2005). Já a análise de associação alélica, pode ser empregada em estudos de caso controle ou em multicasos familiares. O uso de análise de regressão linear ou logística permite a fácil correção de variáveis ambientais e a ampliação da análise para determinar se múltiplos marcadores ou loci mostram efeito independente ou se um marcador carrega a informação do gene associado à doença por estar em desequilíbrio de ligação com esse gene (BLACKWELL et al., 2009). Em relação a essa última abordagem, a espécie canina oferece a vantagem de possuir blocos de haplótipos em desequilíbrio de ligação cerca de 100x mais extensos do que os que ocorrem em humanos, além de baixa diversidade de haplótipos em regiões em alto desequilíbrio de ligação, o que indica que a identificação de marcadores em desequilíbrio de ligação com genes importantes na susceptibilidade à doença requer uma quantidade de marcadores relativamente menor do que quantidade que seria necessária na espécie humana (SUTTER et al., 2004). Dentre as medidas de desequilíbrio de ligação, a medida D' é a que menos sofre influência da frequência alélica dos variantes em desequilíbrio de ligação (HEDRICK, 1987).

A base genética de doenças complexas é caracterizada pela participação de múltiplos genes com efeito moderado. Apesar do baixo poder em detectar genes de efeito pequeno, alguns estudos de análise de ligação ou de associação alélica têm obtido sucesso na

identificação de variantes em genes candidatos ou em desequilíbrio de ligação com genes importantes na imunidade à LV (BLACKWELL et al., 2009). Como exemplo, os genes das quimiocinas CCL1 e CCL16 foram associados a casos de LV (JAMIESON et al., 2007); a tendência na transmissão de diferentes alelos no gene *TNFA* para prole LST+ ou com LV sintomática (KARPLUS et al., 2002); a identificação de alelos nos genes *TGFB1* e *LECT2* independentemente associados à resposta LST+ e de alelos nos genes *IL4* e no intervalo entre os genes *TGFB1* e *LECT2* associados com a resposta LST- (JERONIMO et al., 2007b; FRADE et al., 2011), (**Figura 3**). Essas evidências confirmaram os achados anteriores que descreviam uma maior correlação com o tamanho da área de induração no LST em parentesco de primeiro grau do que em parentescos de segundo ou terceiro grau, além de uma herdabilidade do resultado do LST estimada em 84% quando então foi proposta a existência de um componente genético determinando substancialmente o resultado no LST (JERONIMO et al., 2007a).

Figura 3 – Desenho da região do cromossomo humano 5q23.3-q31.1 mostrando posições relativas dos genes e marcadores de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)

Fonte: (JERONIMO et al., 2007b).

Legenda: As letras e as setas verticais indicam SNPs. Setas brancas indicam SNPs associados ao resultado negativo no teste da leishmanina (LST-) e setas cinzas indicam SNPs associados ao resultado LST+. Setas pretas indicam SNPs sem associação estatisticamente significativa.

O loci que codifica a molécula de histocompatibilidade principal (MHC) é um candidato óbvio para o controle de susceptibilidade à leishmaniose visceral devido ao alto grau de variabilidade genética (KENNEDY et al., 2002) e ao número de doenças associadas (WAGNER; BURNETT; STORB, 1999; KENNEDY et al., 2007; BLACKWELL; JAMIESON; BURGNER, 2009). Em cães, o loci do MHC está localizado no cromossomo 12 e codifica a proteína chamada de antígeno leucocitário canino (DLA). O DLA classe II é constituído por três genes

altamente variáveis *DLA-DRB1*, *DLA-DQB1*, *DLA-DQA* e um monomórfico *DLA-DRA* (WAGNER; BURNETT; STORB, 1999). QUINNELL et al., 2003b identificaram o alelo *DLA-DRB1*01502* associado com níveis aumentados de IgG anti-*Leishmania* e aumento do risco de infecção em estudo de coorte com cães da região norte do Brasil. Já RIBEIRO (2011) identificou associação entre frequência os alelos *DRB1-W*, *DRB1*00101* e *DRB1-T* com resultado negativo no diagnóstico para LVC em cães de Araçatuba – SP.

A chance de identificação de novos genes importantes na LV aumentou com o surgimento do estudo amplo de associação genômica (GWAS), que consiste na genotipagem simultânea de milhares de SNPs mapeados ao longo do genoma em intervalos menores do que 1Mb e dispostos em chips de alta densidade (SNP chips). A etapa seguinte à genotipagem envolve um trabalho árduo de análise estatística, cuja capacidade de sucesso na detecção de SNP verdadeiramente associado ao fenótipo de uma doença complexa depende de diversos fatores, tais como a qualidade da amostra de DNA obtida, representação do alelo de interesse ou em desequilíbrio de ligação com o alelo de interesse no SNP chip, da frequência do alelo na amostra e do tamanho do seu efeito sobre a expressão do fenótipo, da interação entre os genes (epistasia), da acurácia na classificação do fenótipo, de fatores ambientais de confundimento sobre a expressão do fenótipo, da estrutura da população determinada por relações genéticas ocultas e estratificações por diferenças étnicas e geográficas. A magnitude dos efeitos das variáveis citadas acima e a capacidade de controle dos seus efeitos determinam o custo estatístico (tamanho amostral) da análise de associação genômica (BACANU; DEVLIN; ROEDER, 2002; WANG et al., 2005).

O empreendimento de GWAS com amostras robustas (2.000 casos e 3.000 controles) levou à descoberta de variantes genômicas importantes em doenças humanas complexas como doença da artéria coronária, doença de Chron, artrite reumatoide, diabetes do tipo 1 e do tipo 2 (WTCCC, 2007). Nesse campo, o cão pode ser particularmente útil como modelo genético pois determinados fenótipos que são complexos no homem são monogênicos em algumas raças devido ao severo efeito dos fundadores na seleção das raças. Além disso, a maior extensão de blocos de haplótipos e a menor diversidade alélica no cão podem facilitar a descoberta de novos genes (BOYKO, 2011).

A descoberta de associações espúrias sem replicação em amostras independentes é recorrente em estudos de associação alélica, sobretudo em estudos de caso controle de características complexas em que a estratificação por uso de amostras excessivamente

heterogêneas ou relação de parentesco não declarada durante a amostragem pode afetar a viabilidade do resultado da associação até mesmo em estudos cuidadosamente desenhados a priori (HELGASON et al., 2005). Portanto, os estudos de associação genômica, seja de genes candidatos ou abordagem de genotipagem ampla, deveriam levar em consideração a estrutura da amostra (NEWMAN et al., 2001). Ultimamente, o uso de modelos de componentes de variância que levam em conta a estrutura da amostra, como o modelo misto de associação eficientemente acelerada (EMMAX), tem permitido a obtenção de resultados convincentes em GWAS. O EMMAX corrige simultaneamente o efeito de variáveis ambientais e efeito de relação genética aos pares por construção de matriz de distância de identidade por estado (IBS) com a redução do esforço computacional de dias a horas. O uso dessa abordagem tem permitido o aumento da significância de associações verdadeiras que foram replicadas em amostras independentes e a redução da significância de associações espúrias de forma mais eficaz do que outros métodos que consideram a estrutura da população, como por exemplo a análise de componentes principais (PCA), (KANG et al., 2010).

A genética de doenças infecciosas é marcada pela participação de poligenes da resposta imune com efeito moderado e com uma heterogeneidade entre as populações. Essa estrutura genética reflete a pressão de seleção exercida pela interação com patógenos, o que gera uma diversidade de repertório vantajosa ao hospedeiro (MURPHY, 1993; FRODSHAM, 2004). No campo das doenças parasitárias humanas, o GWAS tem permitido a identificação de variantes associados à malária e doença de Chagas (TIMMANN et al., 2012; DENG et al., 2013).

Por considerar o efeito da interação entre o patógeno e o hospedeiro no resultado da infecção, BLACKWELL (2001) construiu um organograma para o estudo genético de doenças infecciosas. Esse organograma recomenda que possíveis estratificações feitas pela genética do patógeno sejam levadas em consideração durante a busca por genes do hospedeiro que afetam a doença. No caso das leishmanioses, até então, os estudos que avaliaram a diversidade populacional de *L. (L.) infantum* isoladas de cães e humanos do novo mundo demonstraram uma baixa diversidade genética do parasito e ausência de associação entre genótipos do parasito e resposta clínica do hospedeiro (KUHLS et al., 2011; BATISTA et al., 2012; FERREIRA et al., 2012; MOTOIE et al., 2013).

O único GWAS empreendido para identificar loci de susceptibilidade à LV humana genotipou 989 casos e 1.089 controles da Índia, onde a LV é causada pela *L. donovani* e 1.970

indivíduos de 308 famílias com 357 casos do Brasil, onde a LV é causada pela *L. (L.) infantum*. Após análise estatística baseada em EMMAX, a região do MHC de classe II humano *HLA-DRB1-
HLA-DQA1* foi a única que mostrou SNPs significativamente associados à doença nas duas populações. A análise de replicação em uma terceira população da Índia com 941 casos e 990 controles mostrou um valor de $P_{\text{combinado}}$ de $2,76 \times 10^{-17}$ e uma odds ratio de 1,41 para um SNP da mesma região do HLA II (FAKIOLA et al., 2013). Esses achados demonstraram a participação do HLA II na susceptibilidade da LV independente da barreira geográfica e do agente causador.

O primeiro GWAS que buscou a identificação de genes de susceptibilidade da LVC genotipou 219 cães infectados da raça boxer, 115 assintomáticos e 104 sintomáticos. Apesar dos marcadores não terem alcançado significância estatística, foi possível estimar que a herdabilidade do fenótipo de doença foi de 64% e que o status clínico foi predito corretamente em 60% dos cães avaliados por utilização do método de validação cruzada, o que sugeriu o caráter herdável da susceptibilidade à LVC (QUILEZ et al., 2012).

Em um estudo mais recente, UTSUNOMIYA et al., 2015, utilizado um modelo EMMAX de análise em um GWAS com 48 cães mestiços de Araçatuba – SP, incluindo 20 cães com diagnóstico positivo de LVC e 28 controles, identificaram um SNP significativamente associado na vizinhança dos genes dos receptores das citocinas IL-2 e IL-15 no cromossomo 2 e outro SNP na vizinhança do gene *TLE1*, no cromossomo 1, que codifica o corepressor transcricional da via Notch, importante na indução da diferenciação linfócitos T CD4⁺ virgens por APCs, o que sugere a importância da diferenciação de subconjuntos de linfócitos T na susceptibilidade da LVC.

Apesar dos achados supracitados, a genética que afeta os diferentes perfis de imunidade contra a LVC em cães permanece inexplorada em estudos de associação genômica. A realização de um GWAS que levasse em consideração estratificações de estrutura da amostra poderia ser útil para identificar novos genes importantes para a compreensão das respostas clínica e imunológica à infecção natural pela *L. (L.) infantum* em cães e apontar novos alvos terapêuticos espécie-específicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores genéticos associados às imunidades celular, humoral e aos status clínico e de infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar diagnósticos clínico, laboratorial e genotipagem ampla para identificar SNPs associados à progressão clínica e ao *status* de infecção por *L. (L.) infantum*;
- Avaliar perfis de imunidade celular e realizar genotipagem ampla para identificar SNPs associados à resposta de hipersensibilidade tardia à leishmanina e resposta proliferativa de linfócitos;
- Avaliar a imunidade humoral e realizar genotipagem ampla para identificar SNPs associados às respostas das imunoglobulinas IgA, IgE, IgG e IgM anti-*L. (L.) infantum* e IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis*.

4 DESENHO EXPERIMENTAL

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram priorizados cães de raça definida, domiciliados e residindo em áreas endêmicas de LVC por pelo menos 18 meses. As coletas de amostras foram autorizadas por meio de termos de consentimento assinados pelos proprietários. Em cada cão foi realizada avaliação clínica; coleta de 20 mL de sangue periférico por punção das veias cefálica, safena ou jugular; coleta de swab bucal, de conjuntiva; punção aspirativa de linfonodo poplíteo ou pré-escapular e o teste da leishmanina (LST).

5.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Biópsia aspirativa dos linfonodos poplíteos ou pré-escapulares (LFND), swab bucal (SB) e swab de conjuntiva (SC) foram coletados, mantidos em tampão NET (0,15 M de NaCl, 50 mM de EDTA, 0,1 M de Tris - HCl [pH 7.5]) e armazenadas a 4°C até a sua utilização. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o kit NucleoSpin (Macherey Nagel®) de acordo com as instruções do fabricante. A identificação dos cães infectados se deu por amplificação de uma região conservada de minicírculo de kDNA de *L. (L.) infantum* contendo 120pb, quando então 10 ng/mL de DNA genômico (amostra) foi adicionada em duplicata à solução de 7,5 mL de KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix 2× (Kapabiosystem, Massachusetts, USA), 0,5 mL de cada iniciador LEISH-1: 5'-ACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG - 3' e LEISH-2: 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3' (FRANCINO et al., 2006) ajustada para o volume final de 15 µL com água ultra deionizada estéril (Promega). A PCR em tempo real consistiu nos seguintes passos: desnaturação a 95 ° C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos, emparelhamento de iniciadores a 58°C durante 20 segundos e extensão a 72°C durante 8 segundos. Posteriormente, foi realizado o passo de dissociação de amplicons, cujas etapas foram de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 15 segundos e 95°C durante 15

segundos. O DNA de referência da cepa de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/strain46) foi utilizado como controle positivo. Aquelas amostras amplificadas cujas curvas de dissociação foram sobrepostas à curva de dissociação do controle positivo, com pico em torno de 83°C, foram consideradas positivas. Amostras amplificadas com curvas de dissociação sobrepostas às curvas do controle de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) ou *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1995/M15280) foram removidas. Foram utilizadas como controle negativo uma amostra de água deionizada estéril que passou por todas as etapas de processamento das amostras (controle de extração de DNA) e outra adicionada no momento da PCR (controle de PCR).

5.3 PCR EM TEMPO REAL QUANTITATIVA

Uma curva padrão foi gerada usando diluição seriada de DNA de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/strain46) nas concentrações de 10^6 a 10^{-3} parasitos/ μ L. A curva padrão foi aceita quando as inclinações variaram de -3,1 a -3,4 com coeficiente de correlação $\geq 0,98$. As amplificações foram realizadas em duplicata de cada ponto da curva padrão, das amostras e dos controles negativos. A carga parasitária absoluta (número de *L. (L.) infantum*) foi estimada por comparação dos valores do ciclo limiar (Ct) das amostras com os valores de Ct da curva padrão cujas concentrações eram conhecidas no programa Realplex® (Eppendorf, German).

5.4 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ANTI-*L. (L.) infantum* E ANTI- HGS de *Lutzomyia longipalpis*

5.4.1 Produção de antígeno bruto de *L. (L.) infantum*

O antígeno bruto de *L. (L.) infantum* foi usado nos testes sorológicos para avaliação da imunidade humoral e no ensaio de linfoproliferação. Amastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/strain46) foram isoladas a partir de fragmento de baço de hamster, incubadas em meio bifásico Novy - Nicolle - Mac Neal (NNN) e Schneider (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado com 10% FBS (Gibco BRL, Nova Iorque, EUA) e 100 µg/mL de gentamicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Schneider completo). Depois de alcançar a fase estacionária de crescimento, 5×10^6 promastigotas/mL foram cultivadas em meio Schneider completo. Promastigotas na fase estacionária de crescimento foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato a 0,15 M, pH 7,2 (PBS). Os parasitos foram lisados por congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido na presença de inibidores de protease e a concentração de proteína no lisado de *L. (L.) infantum* foi mensurada por Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

5.4.2 ELISA para detecção de imunoglobulinas anti-*L. (L.) infantum*

Placas de poliestireno com 96 poços foram cobertas com 10 µg/mL de antígeno bruto em tampão carbonato-bicarbonato 0,01M, pH 9,5 e incubadas durante a noite a 4°C em câmara úmida e em seguida lavadas três vezes (200 µL/poço) com PBS, contendo 0,05% de Tween -20 (PBS-T). O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com 3% de leite desnatado em PBS (150 µL/poço) a 37°C durante 2 horas em câmara úmida. Após lavagem com PBS-T, as amostras de soro e os soros utilizados como controle foram adicionados em duplicata (100 µL /poço) em diluições de 1:80 para IgA, 1:40 para IgE, 1:400 para IgG e 1:200 para IgM. As placas foram incubadas a 37°C durante 1 hora em câmara úmida e em seguida lavadas três vezes

com PBS-T. Após as lavagens, foram adicionados os anticorpos secundários anti-IgA canina a 1:10.000, anti-IgE canina a 1:5.000 e anti-IgM canina a 1:100.000, conjugados com peroxidase e anti-IgG canina a 1:2.000, conjugado com fosfatase alcalina (Bethyl, EUA). Após incubação a 37°C durante 45 minutos em câmara úmida, os poços foram lavados três vezes em PBS-T. Os substratos cromógenos, fosfato de para-nitrofenilo (pNPP) (Sigma-Aldrich, EUA) para IgG e tetrametilbenzidina (TMB) (BD, EUA) para IgA, IgE e IgM foram adicionados em volume de 100 µL por poço e incubados à temperatura ambiente na ausência de luz para desenvolvimento de cor. A reação foi interrompida com 2N de hidróxido de sódio (50µL/poço) para pNPP e 2N de ácido sulfúrico (50µL/poço) para TMB. A absorbância foi mensurada usando filtros de 405 e 450nm, respectivamente, em espectrofotômetro, modelo Multiskan EX (Labsystems, EUA). Os títulos das imunoglobulinas foram expressos em unidades de ELISA (UE) (SOLANO-GALLEGO et al., 2001b). Onze cães de área não endêmica, com exame parasitológico negativo foram utilizados para estabelecer a linha de corte (*cut-off*) da reação que refere-se a média dos controles negativos (UE) somados a três desvios-padrões.

5.4.3 ELISA para detecção de IgG anti-saliva de flebotomíneo

Lutzomyia longipalpis foram capturadas no município de Cametá, Pará, Brasil. As glândulas salivares foram dissecadas de fêmeas F1 com 5 a 7 dias de vida e transferidas para PBS gelado. Grupos de 10 pares de glândulas salivares foram mantidas a -70° C em 20 µL de PBS. Antes do uso, o homogenato de glândulas salivares (HGS) foi preparado por três ciclos de congelamento e descongelamento para o rompimento das glândulas. A concentração de proteína no HGS foi medida por reação de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc).

A reação de ELISA para detecção de anticorpos anti-saliva de *Lutzomyia longipalpis*, foi feita de acordo com (ROHOUSOVA et al., 2005). Placas de ELISA (Corning, USA) foram sensibilizadas com 600ng/mL de solução proteica do lisado de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* em tampão carbonato-bicarbonato 0,01M, pH 9,5, durante a noite, a 4°C. Os poços foram lavados com PBS-T. Seguiu-se a incubação com 10% de leite desnatado em PBS-T durante 2 horas a 37°C para bloquear os sítos de ligação inespecífica. As amostras de soro foram diluídas a 1:400 em PBS-T e incubadas em duplicata por 90 minutos a 37°C. As placas

foram lavada em PBS-T por 3 vezes e em seguida incubadas com anticorpo secundário anti-IgG canina conjugada com fosfatase alcalina na diluição de 1:2.000 (Bethyl, USA) durante 45 minutos a 37°C. Depois de nova série de lavagem com PBS-T, a reação foi revelada pela incubação com fosfato de para-nitrofenilo - pNPP (Sigma-Aldrich, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi bloqueada com solução de hidróxido de sódio 2N (50 µL/poço) e a absorbância foi mensurada a 405 nm em espectrofotômetro, modelo Multiskan EX (Labsystems, EUA). Soros de cães com doença severa foram utilizados como controle positivo da reação e soros de cães de área não endêmica para LV (São Paulo) foram utilizados como controle negativo da reação. Os títulos de IgG anti-saliva de flebotômico foram expressos em unidades de ELISA (UE). A linha de corte (*cut-off*) da reação refere-se a média dos controles negativos somados a dois desvios-padrões.

5.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Sinais clínicos compatíveis com a LVC como dermatite, alopecia, hiperqueratose, onicogribose, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, emaciação, conjuntivite, uveíte, blefarite foram levantados e anotados em uma ficha clínica padronizada (**ANEXO A**). Além disso, os níveis de albumina, globulina, proporção albumina/globulina (A:G), AST, ALT, creatinina e uréia foram avaliados em amostras de soro. Os cães foram agrupados em assintomáticos (AD) e sintomáticos (SD). Para as avaliações de progressão clínica e imunidade humoral, os cães foram classificados de acordo com a adaptação do estadiamento clínico proposto por PALTRINIERI et al., 2010, tal como descrita a seguir: **grupo I - cães não infectados** de área endêmica, negativos na PCR e na sorologia; **grupo II - cães expostos** de área endêmica, negativos na PCR e com baixos níveis de IgG anti-*L. (L.) infantum* (até duas vezes o valor da linha de corte da reação); **grupo III - cães infectados** de área endêmica, positivos na PCR, mas aparentemente sadios; **grupo IV - cães doentes** de área endêmica, positivos na PCR e apresentando sintomas brandos, como linfadenomegalia localizada, dermatite, alopecia, onicogribose e alteração ocular; **grupo V - cães severamente doentes** de área endêmica, positivos na PCR e apresentando além de sintomas do grupo IV, linfadenomegalia sistêmica, esplenomegalia, hepatomegalia, emaciação ou alteração de locomoção.

Dados epidemiológicos como uso de vacinação contra LVC, uso de coleira impregnada com deltametrina, tratamento de LVC, positividade em testes anteriores, desenvolvimento de outras doenças, cuidados veterinários, presença de outros animais e tipo de alimentação foram apurados com possibilidade de serem admitidos como covariáveis nas análises de associação genômica.

5.6 TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA À LEISHMANINA (LST)

Foi preparada uma suspensão antigênica com promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/strain46) na concentração de 4×10^8 parasitos/mL em solução de merthiolate (1:10.000). Um volume de 100 µL de antígeno por via intradérmica foi administrado na região abdominal de cada cão. Após 72 horas, a área de eritema ou nódulo foi mensurada (área de induração). Cães que apresentaram área de induração ≥ 5 mm foram considerados positivos no LST (Silveira et al., 2012). Como controle negativo, a solução de Merthiolate (1:10.000) foi aplicada em uma área adjacente afastada em pelo menos 5 cm do local de inoculação do antígeno específico (leishmanina).

5.7 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO (LPA)

O ensaio de linfoproliferação foi realizado de acordo com (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007b) em 177 cães avaliados também pelo LST. O volume de 10 mL de sangue com EDTA foi misturado a volume igual de PBS estéril e adicionado gentilmente a 1/3 de Histopaque - 1077 (Sigma-Aldrich). As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram separadas do sangue total por gradiente de centrifugação a 1.500 rpm por 30 minutos a 20°C, sem freio. As PBMC foram coletadas e lavadas com a adição de 30 mL de PBS estéril seguida de centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a lavagem, as PBMC foram resuspensas em 2 mL de tampão de lise de eritrócito, agitadas por 45 segundos e repousadas por 15 segundos em gelo. Após a lise, as PBMC foram resuspensas e lavadas duas vezes em 30mL de

PBS estéril. Após as lavagens, as PBMC foram ressuspensas em 2 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 2 mM L-glutamina (Gibco BRL, New York, USA), 20 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N -2- ethanesulphonic acid), 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de FBS, 0,05 mM 2-Mercaptoetanol, 1× MEM solução de aminoácidos não essenciais, 1× MEM solução de vitaminas, 1mM de piruvato de sódio (Gibco BRL, New York, USA). As PBMC foram contadas, plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL e cultivadas em somente RPMI (meio), em RPMI com 2µg/mL de Concanavalina A (ConA) por 72 horas e em RPMI contendo 10 µg/mL de antígeno bruto de *L. (L.) infantum* (Leish) (MHOM/BR/72/strain46) a 37°C e 5% CO₂ por 5 dias. Após incubação, as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram coletados e estocados a -80°C para a posterior avaliação da produção de citocinas. Afim de quantificar a proliferação celular, as PBMC foram incubadas por 18 horas com 10 mM de 5-bromodeoxyuridine e o ensaio colorimétrico foi conduzido conforme as instruções do fabricante (Cell Proliferation ELISA BrdU kit, Roche Diagnostics GmbH, Germany). A absorbância foi mensurada em 450 nm em espectrofotômetro (Multiskan EX, Labsystems). A proliferação de PBMC de cada cão foi apresentada em índice de proliferação (PI) que representa a diferença de absorbância do grupo Leish subtraída da absorbância do grupo meio multiplicada arbitrariamente por 100. O limiar de positividade representa a média do índice de proliferação dos cães não infectados somada a dois desvios padrões.

5.8 PERFIS DE IMUNIDADE CELULAR

Com o propósito de avaliar a carga parasitária e o perfil de citocinas, os cães foram agrupados em 4 perfis designados pelos resultados no LPA e no LST. **LST-/LPA-**, cães negativos em ambos LST e LPA; **LST+/LPA-**, cães que foram positivos no LST e negativos no LPA; **LST-/LPA+** cães que foram negativos no LST e positivos no LPA; **LST+/LPA+**, cães que foram positivos em ambos LST e LPA.

5.9 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Com o objetivo de avaliar a população celular predominante que proliferou sob o estímulo do antígeno de *L. (L.) infantum* em cães dos perfis LST-/LPA-, LST+/LPA-, LST-/LPA+, LST+/LPA+, foram realizados ensaios de ELISA sanduiche (ELISA Development kit DuoSet®, R&D Systems, USA) para quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC de acordo com instruções do fabricante. As citocinas da resposta Th1 (IFN- γ and TNF- α) e Th2/Treg (IL-4, IL-10 e TGF- β) foram quantificadas no sobrenadante de cultura das PBMC. Para os controles negativo e positivo, foram usados sobrenadantes dos grupos meio e ConA de cada cão, respectivamente. Afim de apresentar os níveis de citocinas resultantes do estímulo pelo antígeno específico (Leish), para cada cão, a concentração basal do grupo não estimulado (meio) foi subtraída.

5.10 MENSURAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E SUPERÓXIDO DISMUTASE

O sobrenadante de cultura *ex vivo* de PBMC estimuladas com antígeno de *L. (L.) infantum* por 5 dias (Leish) foi utilizado para quantificação de óxido nítrico (NO), convertido em nitrito, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido dismutase (SOD) pelo Kit de alta sensibilidade Measure-iT® (Invitrogen, USA); Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen, USA); Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman, USA), respectivamente, de acordo com instruções do fabricante.

5.11 GENOTIPAGEM E ANÁLISE DE ESTRUTURA DA AMOSTRA

Amostras de DNA genômico extraídas de sangue total de 189 cães residentes em áreas endêmicas foram genotipados pela Deoxy Biotecnologia (Araçatuba, São Paulo, Brasil),

utilizando o ensaio de genotipagem CanineHD BeadChip (173,662 SNPs) da Illumina®, de acordo com o protocolo do fabricante (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). A estrutura da amostra foi avaliada por análise de escalonamento multidimensional dos dois primeiros componentes principais da matriz de relação genética entre as raças amostradas, no programa RStudio versão 0.98.1103 (disponível em: <https://www.r-project.org/>).

5.12 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA (GWA)

Foram analisadas características binárias (status de infecção, status clínico, resultado no teste da leishmanina [LST], resultado no ensaio de linfoproliferação [LPA]) e características quantitativas (IgA, IgE, IgM, IgG anti-*L. (L.) infantum*, IgG anti-saliva de *Lutzomyia longipalpis*, tamanho da área de induração no LST, índice de proliferação de PBMC no LPA e progressão clínica). Os dados das características quantitativas com distribuição assimétrica de IgA, IgE e progressão clínica foram normalizados usando transformação Box-Cox. Para características quantitativas foi aplicado um modelo linear misto e para as características binárias foi aplicado um modelo logístico misto de acordo com o seguinte: $[y \sim \text{média} + \text{origem} + \text{sexo} + \text{idade} + \text{coleira repelente} + \text{vacinação anti-LVC} + \text{tratamento anti-LVC}]$, com variação na combinação de variáveis independentes a depender da variável dependente testada, no programa RStudio versão 0.98.1103. Em seguida, os resíduos do modelo ajustado foram utilizados como pseudofenótipos para testar a associação entre genótipos e fenótipos em um modelo linear misto controlado para efeitos poligênicos e estrutura da amostra por matriz de distância de identidade por estado IBS (EMMAX) (KANG et al., 2010), implementados em SNP & Variation Suite (SVS) v.8.4.4 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, USA, www.goldenhelix.com). Antes da análise de associação genômica, o conjunto de dados genotípicos foi filtrado de forma que foram removidos os SNP com *call rate* abaixo de 95%, com menor frequência alélica (MAF) abaixo de 5% e com valor de *p* no teste exato para o equilíbrio de Hard-Weinberg (HWE) menor do que 10^{-5} . Amostras com *call rate* menor que 90% também foram removidas. Os marcadores foram priorizados para investigação com base em um nível de significância ($p < 1 \times 10^{-5}$) (UTSUNOMIYA et al., 2015). Um conjunto de 110.165 SNPs passou por todas as filtragens. As regiões de localização dos marcadores considerados significativos foram

pesquisadas na base de referência de genes Ensembl Genes 61, com base na montagem do genoma de referência CanFam 2.0, coordenado por ortologia com o Non-Dog RefSeqGenes no UCSC Genome Browser v323 (<https://genome.ucsc.edu/>) e visualizadas no software Genome Browser da Golden Helix (www.goldenhelix.com). As frequências alélicas dos marcadores significativamente associados foram observadas no total de amostras obtidas. O logaritmo natural da razão de chances da substituição alélica (log – odds ratio) para os marcadores significativamente associados às variáveis binárias foi estimado por modelo de regressão logística completo para o total de amostras no SVS.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS FENOTÍPICOS

Para avaliar se os dados tinham distribuição normal foi usado o teste de normalidade de D'Augustine & Pearson. Para comparar três grupos com distribuição assimétrica foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparação entre dois grupos com distribuição assimétrica foi usado o teste não paramétrico de Mann Whitney. Para análise de correlação foi usado o teste não paramétrico de Spearman. O teste exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre os grupos. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Todos os testes empregados estão disponíveis no programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, Inc.).

5.14 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esse estudo foi conduzido conforme os princípios éticos para pesquisa com animais adotados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo 2391/2011. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AMOSTRAGEM E ESTRUTURA DA AMOSTRA

Foram avaliados 189 cães, sendo 54% (102/189) fêmeas e 46% (87/189) machos oriundos de 11 áreas endêmicas, distribuídas entre os estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal. A frequência de cães com idade de 18 meses – 2 anos foi de 37% (70/189), 3 – 5 anos de 33% (63/189), 6 – 8 de 18% (34/189), 9 – 13 anos de 12% (22/189). As raças amostradas tiveram as seguintes frequências: 33% (62/189) de Labrador (LBD); 18% (35/189) de Rottweiler (RWL); 17% de Pastor Alemão (PAA); 8% (15/189) de Pastor Belga de Malinois (PBM); 5% (10/189) de Golden Retriever (GLD); 1,6% (3/189) de Boxer (BOX); 1,6% (3/189) de Teckel (TKL); 1% (2/189) de Buldog Francês (BFR); 1% (2/189) de Buldog Inglês (BIN); 1% (2/189) de Cocker Spaniel (CSP); 1% (2/189) de Dobermann (DBM); 1% (2/189) de Pastor Branco Suíço (PBS); 1% (2/189) de Pinscher (PSC); 1% (2/189) de São Bernardo (SBD); 1% (2/189) de Spitz Alemão (SPT); 0,5% (1/189) de Blood Hound (BDH); 0,5% (1/189) de Dogo Argentino (DAG); 0,5% (1/189) de Fox Terrier (FOX); 0,5% (1/189) de Galgo Italiano (GLG); 0,5% (1/189) de Poodle (PDL) e 4,2% (8/189) sem raça definida (SRD). A **Tabela 1** demonstra as raças de cão mais representativas em cada área endêmica. Aproximadamente, 24% (46/189) dos cães amostrados receberam algum tipo de vacina contra LVC; 49% (92/189) dos cães usaram coleira impregnada com deltametrina (coleira repelente) em algum momento da vida e 19% (36/189) foram tratados contra LVC.

Tabela 1 - Raças mais representativas de cada área endêmica e o número (N) total de cães amostrados em cada área

Origem	Raças	N
Andradina-SP	Labrador, Boxer	14
Araçatuba-SP	Labrador, Rottweiler, Golden Retriever, Pastor Alemão, Pastor Belga de Malinois	32
Bauru-SP	Labrador, Rottweiler, Pastor Alemão, Pastor Belga de Malinois	11
Belo Horizonte-MG	Pastor Alemão, Boxer e Rottweiler	10
Brasília-DF	Labrador, Golden Retriever	16
Camaçari-BA	Labrador, Rottweiler, Pastor Alemão	30
Campinas-SP	Rottweiler, Pastor Alemão, Pastor Belga de Malinois	11
Cotia-SP	Labrador, Rottweiler	8
Panorama-SP	Labrador, Pastor Alemão, Pastor Belga de Malinois	6
Presidente Prudente-SP	Labrador, Rottweiler, Pastor Alemão, Pastor Belga de Malinois	30
São Paulo-SP*	Labrador, Pastor Alemão, Pastor Belga de Malinois	21
Total		189

Fonte: (BATISTA, 2016).

Nota: (*) cães oriundos de áreas endêmicas e avaliados em São Paulo – SP.

A estrutura da amostra foi avaliada pela análise de escalonamento multidimensional da matriz de relacionamento genético entre as raças amostradas. Os dois primeiros componentes principais (C1 e C2) agruparam em 6 conjuntos genéticos contidos na amostra, três homogêneos e três heterogêneos. Um conjunto contendo Labradores, um Galgo Italiano e um Cocker Spaniel, o conjunto dos Rottweilers, o conjunto dos Pastores Alemães, um conjunto contendo Pastor Belga de Malinois e Pastor Branco Suíço, outro contendo Golden Retriever e o conjunto formado por uma mistura de raças menos representadas na amostra (**Figura 4**).

Figura 4 – Análise de escalonamento multidimensional da matriz de relacionamento genético entre as raças amostradas

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Agrupamento dos dois primeiros componentes principais (C1 e C2) em três conjuntos homogêneos e três conjuntos heterogêneos. LBD – Labrador (preto), GLG – Galgo Italiano (rosa choque), CSP – Cocker Spaniel (mostarda), RWL – Rottweiler (azul), PAA – Pastor Alemão (vermelho), PBM – Pastor Belga de Malinois (verde), PBS – Pastor Branco Suíço (laranja), GLD – Golden Retriever (amarelo).

Devido à distorção que as raças mais abundantes (LBD, RTW, PAA, PBM, PBS e GLD) exerceram sobre o escalonamento multidimensional, nenhum dos dois componentes principais foi capaz de representar as raças mais escassas (outras raças). Esse padrão de agrupamento genético inviabilizou o uso dos componentes principais nos modelos de regressão como covariáveis capazes de corrigir efeito de estrutura da amostra na associação genômica (PRICE et al., 2006). Por consequência, optou-se por empregar o método EMMAX para associação entre fenótipos e genótipos (KANG et al., 2010).

6.2 DIAGNÓSTICOS SOROLÓGICO E PARASITOLÓGICO

Os resultados da PCR mostraram que as amostras de LFND foram positivas em 50% das amostras testadas, as amostras de SB foram positivas em 34,5% das amostras testadas e as amostras de SC foram positivas em 29% das amostras testadas. O kDNA de *L. (L.) infantum* foi amplificado, em pelo menos uma das três amostras testadas (LFND, SB, SC) de 132 dos 189 cães testados. Portanto, a prevalência de cães infectados foi de aproximadamente 70%, sendo que as amostras de swab conferiram um acréscimo de 20% de positividade às amostras de LFND. Esse resultado é comparável com o que foi observado por (SOLANO-GALLEGÓ et al., 2001a; LEONTIDES et al., 2002). Esses pesquisadores observaram uma prevalência de 63%, utilizando PCR em cães da região do Mar Mediterrâneo, onde a transmissão da LVC ocorre durante estações. Em relação ao diagnóstico sorológico, 93 dos 189 cães testados tiveram níveis detectáveis de IgG anti-*L. (L.) infantum*, portanto a prevalência detectada pelo ELISA foi de aproximadamente 49%. Quando consideramos a PCR como padrão ouro, a sensibilidade do ELISA foi de 53%, especificidade de 50%, valor preditivo positivo de aproximadamente 31% e o valor preditivo negativo foi de aproximadamente 71% (**Tabela 2**). O mesmo teste sorológico alcançou 98% de sensibilidade quando a imunohistoquímica foi adotada como exame parasitológico e padrão ouro do diagnóstico, como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo (LARANJEIRA et al., 2014). Essa discrepância evidencia a alta sensibilidade da PCR em relação ao ELISA. Devido aos altos valores de sensibilidade e especificidade, o resultado da PCR foi considerado para a análise de associação genômica ao status de infecção. Em análise de regressão multivariada, o status de infecção não foi significativamente associada a nenhuma variável não genética testada (**Tabela 3**).

Tabela 2 - Comparação do desempenho do ELISA e da PCR no diagnóstico da infecção natural pela *L. (L.) infantum* em cães

	PCR- (%)	PCR+ (%)	Total
ELISA-	30 (16)	66 (35)	96 (51)
ELISA+	27 (14)	66 (35)	93 (49)
Total	57 (30)	132 (70)	189 (100)

Fonte: (BATISTA, 2016).

Tabela 3 – Análise de regressão multivariada de características não genéticas do hospedeiro na infecção natural pela *L. (L.) infantum* em cães

Características não genéticas	Status de infecção	
	Efeito estimado	Valores de <i>p</i>
Idade	0,02585	0,758
Sexo	-0,16828	0,698
Origem	-17,41413	0,992
Coleira repelente	-0,57636	0,290
Vacina LVC	0,82459	0,353
Tratamento LVC	17,14158	0,9874

Fonte: (BATISTA, 2016).

6.3 ASSOCIAÇÃO GENÔMICA À INFECÇÃO POR *L. (L.) infantum*

A análise de associação genômica ao status de infecção foi realizada com os dados fenotípicos gerados no diagnóstico parasitológico.

6.3.1 Associação genômica ao status de infecção

Para essa análise foram usadas amostras de 183 cães de área endêmica (132 infectados e 51 não infectados), sendo que 148 passaram por todas as filtragens e foram testadas no GWAS. O fator de inflação foi aproximadamente um, indicando o controle do efeito de estrutura da população sobre a associação. Foram identificados três marcadores significativos nos cromossomos 21 e 34 (**Figura 5**).

Figura 5 – A análise de associação genômica identificou três marcadores associados ao status de infecção pela *L. (L.) infantum* ($p < 10^{-5}$) distribuídos entre os cromossomos 21 e 34.

Fonte: (BATISTA, 2016).

No cromossomo 21, foi identificado o SNP BICF2P991516, $p = 4,5 \times 10^{-6}$, localizado na posição 2.349.517. Esse marcador está localizado a aproximadamente 1232 Kb e em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,618$) com um SNP próximo ao gene *PRGR_CANFA* (*PGR*) que codifica o receptor da progesterona (**Figura 6**). Esse resultado supõe que possa haver alguma influência do sexo sob a susceptibilidade à LVC. Em relação à LV humana, estudos vêm demonstrando que o sexo masculino é associado à infecção pela *L. (L.) infantum* quando o LST é utilizado como método de diagnóstico e ao desenvolvimento de doença sintomática, o que sugere influencia hormonal na susceptibilidade à LV (BELO et al., 2013). Já em relação aos cães avaliados em nosso estudo, a presença da infecção não foi significativamente associada ao sexo (**Tabela 3**), assim como nenhuma associação foi observada entre sexo e o diagnóstico de LVC por DA COSTA et al., 2015. Em estudo experimental, LU et al., 2015 demonstraram que a ativação de macrófago murino pela progesterona induziu o aumento da expressão de RNAm para IL-1 β , TNF- α e cicloxigenase. Esse marcador poderia representar um alvo de indução de resposta inflamatória característica da infecção pela *L. (L.) infantum*. O alelo B (código de alelo A/B da Illumina®) apresentou frequência de 93,5% nos cães infectados, de 92% nos cães não infectados, uma odds ratio estimada em $1,26 \pm 1,25$ e foi associado a um maior risco de infecção (**Figura 7**).

Figura 6 – Gráfico da região do cromossomo 21 mostrando a localização do marcador BICF2P991516, $p = 4,5 \times 10^{-6}$ associado ao status de infecção pela *L. (L.) infantum*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado a aproximadamente a 1232 Kb do gene *PRGR_CANFA*. O gráfico LD mostra o desequilíbrio de ligação ($D' = 0,618$) com um SNP próximo ao gene *PRGR_CANFA*.

Figura 7 – Comparação da proporção de cães infectados entre os genótipos do SNP BICF2P991516 com localização próxima ao gene *PRGR_CANFA*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Aumento do risco de infecção por *L. (L.) infantum* em cães portadores do alelo B.

Ainda no cromossomo 21, o SNP BICF2P918770, $p = 4,98 \times 10^{-6}$, foi identificado na posição 11.185.288. Esse marcador está localizado no gene *GRM5* que codifica o Receptor de Glutamato Metabotrópico 5. Esse SNP está em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,68$) com um SNP no gene *NOX4*, que codifica a enzima NADPH oxidase 4 geradora de ânion superóxido importante para a morte intracelular de *Leishmania*. Na mesma região e apresentando dois

SNPs em desequilíbrio de ligação total ($D' = 1$) com o SNP sinificativamente associado, encontra-se o gene *RAB38*, vizinho do gene da protease Catepsina C (*CTSC*) (**Figura 8**). A proteína 38 ligadora de GTP relacionado à RAB (Rab38) está envolvida com o recrutamento de protease Catepsina para o fagossomo tardio em macrófagos e é diferentemente recrutada para vacúolos contendo *Mycobacterium tuberculosis*. O atraso do recrutamento da Rab38 foi associado à diminuição do recrutamento de Catepsina D e contribuiu para a inibição da maturação do fagossomo e da biogênese do fagolisossomo no macrófago (SETO; TSUJIMURA; KOIDE, 2011). O SNP BICF2P918770 pode representar um variante de regulação negativa da Rab38 que favorece a virulência da *L. (L.) infantum*. Alguns pesquisadores demonstraram que regiões repetidas do lipofosfoglicano (LPG) da *Leishmania* inibem a fusão do fagossoma com o lisossoma e que esse atraso seria necessário para permitir a transformação de promastigotas em amastigotas resistentes às proteases lisossomais (DERMINE et al., 2000; SACKS; SHER, 2002). Aqui, o alelo B apresentou frequência de aproximadamente 95% nos cães infectados, de 90% nos cães não infectados e uma odds ratio estimada em $1,98 \pm 1,88$. Esse alelo foi associado com o aumento do risco de infecção. Esses dados apontam variantes do hospedeiro que pode favorecer *Leishmania* por evitar a sua eliminação por proteases lisossomais e são compatíveis com a persistência da infecção associada ao alelo B (**Figura 9**).

Figura 8 – Gráficos da região do cromossomo 21 mostrando a localização do marcador BICF2P918770, $p = 4,98 \times 10^{-6}$ associado ao status de infecção pela *L. (L.) infantum*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado próximo aos genes *NOX4* (ENSCAFG00000004369), *CTSC* (ENSCAFG00000004384) e *RAB38* (ENSCAFG00000004387). Gráfico LD mostrando desequilíbrio de ligação com os genes *NOX4* ($D' = 0,68$) e *RAB38* ($D' = 1$).

Figura 9 – Comparação da proporção de cães infectados entre os genótipos do SNP BICF2P918770 localizado próximo aos genes *NOX4*, *RAB38* e *CTSC*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Aumento do risco de infecção por *L. (L.) infantum* em cães portadores do alelo B.

No cromossomo 34, o SNP BICF2P437413, $p = 5,8 \times 10^{-6}$, está localizado na posição 34.726.552. O alelo B apresentou frequência de 96,5% nos cães infectados, de 89,2% nos cães não infectados e uma odds ratio estimada em $3,42 \pm 3,58$. Esse marcador está localizado na vizinhança e em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,93$) com um SNP do gene *PRKCI* (**Figura 10**). Esse gene codifica a Proteína Quinase C (PKC) Iota que é envolvida com transdução de

inúmeras vias de sinalização na célula, incluindo a sinalização que ativa a NADPH oxidase. Alguns estudos demonstraram que a infecção pela *L. donovani* inibe a ativação de PKC e reduz o teor de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio resultando no aumento da infecção em macrófagos (OLIVIER; BROWNSEY; REINER, 1992; MOORE; LABRECQUE; MATLASHEWSKI, 1993; SACKS; SHER, 2002). Esse variante em LD com o *PRCKI* pode representar diminuição da atividade da NADPH oxidase que acaba por favorecer a sobrevivência da *L. (L.) infantum*.

Figura 10 – Gráficos da região do cromossomo 34 mostrando a localização do marcador BICF2P437413, $p = 4,98 \times 10^{-6}$ associado ao status de infecção pela *L. (L.) infantum*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado nas proximidades do gene *PRCKI* (ENSCAFG00000014823). Gráfico LD mostrando desequilíbrio de ligação ($D' = 0,93$) com um SNP no gene *PRCKI*.

Na mesma região encontra-se o gene *SMAD7* (**Figura 11**) que codifica o regulador antagonista da sinalização desencadeada pelo TGF- β , que por sua vez, induz a diferenciação de linfócitos Treg ou Th17 (YAN; LIU; CHEN, 2009; LITTMAN; RUDENSKY, 2010); do gene *IL1RAP* (**Figura 11**), que codifica uma proteína acessória do receptor da citocina pró inflamatória da imunidade inata IL-1, cujos variantes genômicos foram associados à susceptibilidade à leishmaniose visceral experimental (HUANG et al., 1997; MORAVEJ et al., 2012); e do gene *IL12A_CANFA* (**Figura 11**) que codifica uma subunidade p35 da citocina IL-12. Essa citocina induz produção de IFN- γ por células T e células NK e é importante para a diferenciação da resposta Th1 (BACELLAR et al., 1996). Aqui nós observamos associação do alelo B com a resposta Th1 sem alteração dos níveis de TGF- β e da IL-10 (**Figura 12**). A partir desse dado nós comparamos os níveis de IFN- γ e IL-10 em sobrenadante de PBMC estimulada com antígeno

específico entre cães não infectados (CTL), assintomáticos (AD) e sintomáticos (SD) e notamos aumento de ambos IFN- γ e IL-10 em cães infectados (AD e SD) em comparação aos cães CTL. Com isso, a contribuição possível do marcador SNP BICF2P437413 para esse perfil de resposta pode estar no aumento dos níveis de IFN- γ induzido pelo antígeno de *L. (L.) infantum* (**Figura 13**). O aumento de ambos, IFN- γ e IL-10 após a infecção por *L. (L.) infantum* vem sendo descrito em cães infectados naturalmente, onde o aumento da IL-10 é geralmente associado ao aumento da carga parasitária (ALVES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; MENEZES-SOUZA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2013).

Figura 11 – Gráficos da região do cromossomo 34 mostrando a localização do marcador BICF2P437413, $p = 4,98 \times 10^{-6}$ associado ao status de infecção pela *L. (L.) infantum*.

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado nas proximidades dos genes *SMAD7*, *IL1RAP* e *IL12A_CANFA*.

Figura 12 – Comparação da proporção de cães infectados e do nível de IFN- γ , TNF- α , NO (Nitrito), TGF- β e IL-10 entre os genótipos do SNP BICF2P437413 localizado próximo aos genes *SMAD7*, *IL1RAP* e *IL12A_CANFA*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo B com a infecção por *L. (L.) infantum* e com o aumento da resposta Th1 (IFN- γ , TNF- α e NO), sem alteração dos níveis das citocinas regulatórias TGF- β e IL-10.

Figura 13 – Níveis de IFN- γ e IL-10 quantificados nas culturas de PBMC

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: IFN- γ e IL-10 foram quantificados no sobrenadante de cultura de PBMC estimuladas com antígeno de *L. (L.) infantum* ou só meio por 5 dias. **CTL** indica cães não infectados, **AD** indica cães infectados assintomáticos e **SD** indica cães infectados sintomáticos. Os boxplots representam as medianas e os intervalos interquartis das subtrações dos níveis de citocinas no grupo Leish pelo grupo meio de cada cão. *p < 0,05, **p < 0,01 (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

6.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Dos 132 cães infectados, 76 (58%) apresentaram pelo menos um sintoma compatível com LVC e 56 (42%) foram assintomáticos. Esse resultado representou o status clínico dos cães infectados avaliados no estudo. Quando foi utilizada a classificação clínica baseada no estadiamento, encontramos os seguintes resultados: **grupo I** - 21 (11%) cães foram negativos nos testes diagnósticos; **grupo II** – 12 (6%) cães foram assintomáticos e positivos apenas no teste sorológico com níveis de IgG – anti *L. (L.) infantum* até duas vezes o valor da linha de corte da reação; **grupo III** – 56 (30%) cães assintomáticos e positivos no diagnóstico parasitológico; **grupo IV** – 52 (27%) cães positivos no exame parasitológico apresentando sintomas brandos compatíveis com a LVC; **grupo V** – 24 (13%) cães positivos no exame parasitológico apresentando sintomas severos compatíveis com a LVC. Dos 189 cães avaliados, 24 (13%) apresentaram parâmetros de clínica e diagnóstico fora dos critérios de classificação pré-determinados e não foram considerados para as análises de progressão clínica. Portanto, 165 cães foram avaliados quanto à progressão clínica.

As alterações bioquímicas não foram exclusivas dos cães infectados e sintomáticos, porém se tornaram mais frequentes ao passo em que houve o agravamento clínico da LVC. Esse quadro é típico da população mantida sob condições naturais em áreas endêmicas brasileiras, em que a LVC ocorre em concomitância com outras patologias (CASTRO; VINICIUS; SOUSA, 2012) ou de forma indetectável pelos métodos diagnósticos empregados no estudo. A **Tabela 4** reúne os resultados de diagnóstico e os achados clínicos e bioquímicos em cada grupo de progressão clínica.

Tabela 4 – Proporção de resultados positivos nos diagnósticos parasitológico, sorológico e dos achados clínicos e bioquímicos em cada grupo de progressão clínica

Grupo clínico (n)	PCR+/testados	ELISA+/testados	Achados clínicos/testados	Achados bioquímicos/testados*
I. não infectado (21)	0/21	0/21	0/21	Hiperglobulinemia (0/21) ALT (7/21) AST (6/21) Creatinemia (4/21) Uremia (2/21)
II. exposto (12)	0/12	12/12	0/12	Hiperglobulinemia (0/12) ALT (4/12) AST (3/12) Creatinemia (2/12) Uremia (1/12)
III. infectado (56)	56/56	18/56	0/56	Hiperglobulinemia (10/56) ALT (9/56) AST (16/56) Creatinemia (9/56) Uremia (9/56)
IV. doente (52)	52/52	39/52	Palidez de mucosa (5/52) Linfadenomegalia (45/52) Alopecia (26/52) Dermatite (27/52) Hiperqueratose (13/52) Onicogribose (9/52) Alterações oculares (13/52)	Hiperglobulinemia (35/52) ALT (29/52) AST (33/52) Creatinemia (13/52) Uremia (12/52)
V. severamente doente (24)	24/24	24/24	Palidez de mucosa (6/24) Linfadenomegalia (19/24) Alopecia (16/24) Dermatite (16/24) Hiperqueratose (9/24) Onicogribose (15/24) Alterações oculares (11/24) Linfadenomegalia sistêmica (4/24) Esplenomegalia (17/24) Hepatomegalia (7/24) Emaciação (3/24)	Hiperglobulinemia (21/24) ALT (14/24) AST (18/24) Creatinemia (6/24) Uremia (5/24)

Fonte: (BATISTA, 2015).

Nota: (*) Valores de referência segundo KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008.

A análise de regressão multivariada mostrou que o status clínico foi negativamente associado com o uso de coleira repelente ($p < 0,001$), o que indicou proteção clínica provida pela prevenção da exposição à picada do flebotomíneo. Proteção provida pelo uso de coleira repelente foi observada também por (MANZILLO et al., 2006). Quando a resposta clínica foi

avaliada pela progressão clínica, nós observamos associação com a idade ($P < 0,05$), e uma associação mais intensa com ambos, uso da vacina contra LVC ($P < 0,001$) e do tratamento contra LVC ($P < 0,001$), (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de regressão multivariada de características não genéticas do hospedeiro na resposta clínica à infecção natural pela *L. (L.) infantum* em cães

Variáveis não genéticas	Status clínico		Progressão clínica	
	Efeito estimado	Valores de p	Efeito estimado	Valores de p
Idade	0,13278	0,140822	-	0,04099 *
Sexo	-0,78874	0,122583	-	0,28765
Origem	NS	NS	-	0,42994
Coleira repelente	-1,83903	$6,87 \times 10^{-4} ***$	-	0,95852
Vacina LVC	-0,54384	0,411055	-	$2,036 \times 10^{-5} ***$
Tratamento LVC	21,55861	0,990051	-	$7,709 \times 10^{-10} ***$

Fonte: (BATISTA, 2016).

Nota: NS – não significante; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.5 ASSOCIAÇÃO GENÔMICA À RESPOSTA CLÍNICA DA INFECÇÃO NATURAL PELA *L. (L.) infantum*

Os cães foram avaliados quanto aos parâmetros clínicos compatíveis com a LVC e classificados em assintomáticos ou sintomáticos. A partir dessa avaliação clínica, nós realizamos análise de associação genômica ao status clínico. Posteriormente, os cães foram classificados de acordo com o estadiamento clínico da LVC, a partir dessa classificação, nós realizamos análise de associação genômica à progressão clínica da doença.

6.5.1 Associação genômica ao status clínico

Para essa análise, foram avaliados 132 cães com diagnóstico parasitológico positivo para infecção pela *L. (L.) infantum*, sendo 56 assintomáticos e 76 sintomáticos. Desses, 126 cães passaram pelas filtragens e foram testados no GWAS. O fator de inflação genômica foi

aproximadamente um, indicando controle do efeito da estrutura da população sobre a análise. Um SNP do cromossomo 18 foi significativamente associado ao status clínico (**Figura 14**).

Figura 14 – A análise de associação genômica identificou um marcador associado ao status clínico ($p < 10^{-5}$) localizado no cromossomo 18.

Fonte: (BATISTA, 2016).

O SNP BICF2P914789, $p = 6,73 \times 10^{-6}$, localiza-se na posição 36.551.193 do cromossomo 18. O alelo B apresentou frequência de 28,6% nos cães assintomáticos e de 61,3% nos cães sintomáticos e uma odds ratio estimada em $3,96 \pm 2,18$. Esse marcador está localizado a aproximadamente 108 Kb e em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,53$) com o gene *CATA_CANFA*, que codifica a enzima catalase (**Figura 15**). Essa enzima é um antioxidante importante na defesa contra o estresse oxidativo, ela mitiga os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio convertendo-o em oxigênio e água. A diminuição dos níveis da catalase e da glutathiona peroxidase no sangue foi recentemente associada com o aumento da peroxidação lipídica e com alterações histopatológicas em cães com LVC sintomática (SOUZA et al., 2014). Nos cães amostrados, o alelo B foi associado aos cães sintomáticos, ao aumento de H_2O_2 em PBMC em manutenção do nível de superóxido dismutase, o complexo antioxidante que converte O_2^- em H_2O_2 (**Figura 16**). Esses dados indicam que o alelo B está associado à redução da atividade da catalase em animais sintomáticos.

Figura 15 – Gráficos da região do cromossomo 18 mostrando a localização do SNP BICF2P914789, $p = 6,73 \times 10^{-6}$ associado ao estado clínico da LVC.

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado a aproximadamente a 108 kb do gene *CATA_CANFA*. Gráfico LD mostrando desequilíbrio de ligação ($D' = 0,53$) com um SNP do gene *CATA_CANFA*.

Figura 16 – Comparação da proporção de cães sintomáticos e do nível de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido dismutase (SOD) entre os genótipos do SNP BICF2P914789 localizado próximo ao gene *CATA_CANFA*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo B com LVC sintomática e com o aumento de H_2O_2 na diminuição dos níveis da superóxido dismutase (SOD).

Com base nesse resultado, nós avaliamos o nível de H_2O_2 , NO e superóxido dismutase no sobrenadante da cultura de PBMC estimulada com antígeno de *L. (L.) infantum* durante o LPA em cães não infectados, cães assintomáticos e cães sintomáticos, além de compararmos a carga parasitária no linfonodo entre cães assintomáticos e sintomáticos com o objetivo de investigar o papel das ROS e do NO na morte de *L. (L.) infantum* pelos fagócitos e seus envolvimento com o agravamento da LVC. Os resultados dessa análise estão apresentados na **Figura 17**.

Figura 17 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido dismutase (SOD) e nitrito em cultura de PBMC e comparação da carga parasitária no linfonodo em cães de área endêmica para LVC

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: H_2O_2 , SOD e nitrito foram mensurados em sobrenadante de cultura de PBMC após o estímulo com antígeno de *L. (L.) infantum* por 5 dias. A carga parasitária foi estimada por quantificação de DNA de *L. (L.) infantum* em biópsia aspirativa de linfonodo por qPCR. **CTL** indica cães não infectados, **AD** indica cães infectados assintomáticos e **SD** indica cães infectados sintomáticos. *p < 0,05, **p < 0,01 (testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

O nível de H_2O_2 foi reduzido nos cães assintomáticos em comparação com os cães não infectados ($p < 0,01$), já em cães sintomáticos, a produção de H_2O_2 foi retomada para níveis equivalentes aos observados nos cães não infectados. Esse resultado indicou que a infecção suprimiu a produção de H_2O_2 . Uma provável associação desse resultado com o SNP BICF2P914789 em desequilíbrio de ligação com o gene da catalase seria o atraso da redução dos níveis da catalase induzido pela *L. (L.) infantum* resultando na diminuição dos níveis de H_2O_2 nos estágios iniciais da infecção, o que favoreceria a sobrevivência dos parasitos nos fagócitos. De fato, nossos dados mostraram a diminuição do H_2O_2 na fase assintomática da infecção. Esse efeito foi revertido em parte pelo aumento dos níveis de SOD ($p < 0,05$) e pela provável diminuição de catalase e glutathione peroxidase em cães sintomáticos, como demonstrado por (SOUZA et al., 2014). Embora os níveis de H_2O_2 tenham sido reconstituídos, não houve melhora clínica e nem controle da infecção. A comparação da carga parasitária no

linfonodo mostrou que a replicação da *L. (L.) infantum* foi maior em cães sintomáticos ($p < 0,01$). Um aumento do nível de NO em PBMC de cães assintomáticos poderia explicar um maior controle da infecção nesses cães. Como esperado, nossos dados demonstraram que houve aumento dos níveis de NO em cães assintomáticos em comparação com os cães não infectados ($p < 0,05$), entretanto, para a nossa surpresa, houve um aumento ainda maior em cães sintomáticos ($p < 0,01$) e nenhuma diferença entre assintomáticos e sintomáticos. Os dados apresentados apontam para uma incapacidade do H_2O_2 e do NO em eliminar os parasitos. Ao contrário disso, esses radicais foram associados com um estado clínico pior. De acordo com (WILSON; ANDERSEN; BRITIGAN, 1994) a exposição da *L. (L.) infantum* a doses subletais de H_2O_2 e O_2^- leva a uma resposta ao estresse e torna os parasitos mais resistentes à H_2O_2 . Mais recentemente, foram demonstradas *L. (L.) infantum* isoladas de pacientes refratários ao tratamento com antimoniato pentavalente e que se mostraram resistentes ao NO (DENG et al., 2013). O NO é sintetizado pela enzima NO Sintetase II (NOS II) que por sua vez compete pela L-arginina com a Arginase, essa enzima hidrolisa arginina para formar a poliamina ornitina, essencial para o crescimento da *Leishmania* spp.. Essas vias antagônicas controlam a carga de infecção intracelular em fagócitos e são reguladas pelo balanço Th1/Th2. Enquanto IFN- γ induz a NO sintetase e a atividade microbicida do fagócito, a IL-4 e a IL-10 induzem arginase que aumenta a concentração de poliaminas e favorece a sobrevivência intracelular do parasito (CORRALIZA et al., 1995; INIESTA; GÓMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001). Na **Figura 13**, nós demonstramos que os níveis de IFN- γ e IL-10 foram aumentados em sobrenadante de PBMC de cães infectados, sem nenhuma diferença entre cães sintomáticos e assintomáticos. Esse perfil de resposta mista Th1/Th2/Treg pode explicar os níveis equivalentes de NO entre cães assintomáticos e sintomáticos. De forma concisa, o aumento da carga parasitária no linfonodo em cães sintomáticos parece ter maior relação com o aumento da SOD e a provável redução do nível de O_2^- do que com os níveis de NO e H_2O_2 . Uma avaliação dos níveis de O_2^- poderia confirmar essa hipótese.

6.5.2 Associação genômica à progressão clínica da LVC

Os cinco grupos do estadiamento clínico (I, II, III, IV e V) descritos acima foram convertidos nos scores de progressão clínica (1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente) e analisados no GWAS como variáveis quantitativas.

Para essa análise, foram utilizados 165 cães, 21 cães com score 1, 12 cães com score 2, 56 cães com score 3, 52 cães com score 4 e 24 cães com score 5. O fator de inflação foi aproximadamente um, mostrando que houve controle do efeito das variáveis poligênicas resultantes da estrutura da população sobre a análise. Dois SNPs foram significativos ($p < 10^{-5}$) (**Figura 18**). Ambos os SNPs foram significativos também na análise com os fenótipos não transformados, porém, obteve-se maior controle genômico com a transformação Box-cox.

Figura 18 – A análise de associação genômica identificou dois marcadores associados com a progressão clínica da LVC ($p < 10^{-5}$) localizados nos cromossomos 3 e 12

Fonte: (BATISTA, 2016)

O SNP BICF2G630350444, $p = 4,64 \times 10^{-6}$, está localizado na posição 75.811.526 do cromossomo 3. O alelo B apresentou frequência de 41,6% nos cães amostrados. Esse SNP pertence ao gene *LIAS* que codifica a enzima ácido lipoico sintetase (Lias) (**Figura 19**). A Lias sintetiza o ácido lipóico alpha (ALA) que funciona como um cofator essencial em diversas reações incluindo metabolismo energético e inúmeras atividades antioxidativas que mitigam os efeitos do estresse oxidativo além de inúmeras aplicações terapêuticas (PACKER, 1995; MAYR et al., 2014). ALA foi descrito como indutor do aumento dos níveis de glutathiona intracelular em linfócitos humanos (HAN; TRITSCHLER; PACKER, 1995) e reverteu a diminuição dos níveis de superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase no fígado, rins e cérebro em inflamação induzida por zymosan em camundongos (GOC et al., 2015). Essas enzimas antioxidantes parecem ser importantes na patogênese da LVC, uma vez que em cães com LVC sintomática, a diminuição da glutathiona peroxidase e da catalase foi associada ao aumento da

peroxidação lipídica (SOUZA et al., 2014). ALA parece ser importante também para o parasito. Foi demonstrado que a *L. donovani* faz a redução extracelular do ácido lipóico alpha para realizar o transporte transmembrana de elétrons (DATTA; BERA, 2001). Aqui, nós observamos que o alelo B do SNP BICF2G630350444 foi associado a um risco menor de desenvolvimento de doença sintomática em comparação com o alelo A e a uma diminuição do peróxido de hidrogênio em sobrenadante de cultura de PBMC. Em contraste, o alelo A foi associado com o aumento do risco de infecção pela *L. (L.) infantum* e com a LVC sintomática (Figura 20). O aprofundamento da avaliação do papel desse SNP na geração de enzimas antioxidantes, na proteção do cão ou no favorecimento da infecção se faz necessário, uma vez que o ALA pode representar um possível alvo terapêutico.

Figura 19 – Gráficos da região do cromossomo 3 mostrando a localização do marcador SNP BICF2G630350444, $p = 4,64 \times 10^{-6}$ associado à progressão clínica da LVC. SNP localizado no gene *LIAS*.

Fonte: (BATISTA, 2016).

Figura 20 – Comparação da proporção de cães infectados, sintomáticos, do nível de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e progressão clínica entre os genótipos do SNP BICF2G630350444 localizado próximo ao gene *LIAS*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo A com LVC sintomática e com o aumento de H_2O_2 , enquanto o alelo B foi associado com proteção clínica e diminuição do H_2O_2 . As barras do histograma representam os estágios 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

O segundo SNP que teve significância estatística foi o BICF2P989309, $p = 5,07 \times 10^{-7}$, localizado na posição 23.597.411 do cromossomo 12. Esse SNP, cujo alelo A teve uma frequência de 22,7% nos cães avaliados, encontra-se numa região do cromossomo 12 a aproximadamente 746 Kb em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,98$) com os genes *IL17A* e *IL17F* (**Figura 21**). Esses genes codificam a citocina pró inflamatória IL-17. A IL-17, juntamente com o IFN- γ foi descrita recentemente como uma citocina protetora em modelo experimental murino da LV e na infecção natural pela *L. (L.) infantum* em cães (NASCIMENTO et al., 2015a, 2015b). Além disso, HOSEIN et al., 2015 demonstraram que a transcrição de IL-17 foi significativamente reduzida no início da infecção pela *L. (L.) infantum* em modelo experimental de susceptibilidade da LVC. Nos cães amostrados no presente estudo, o alelo A

preveniu o agravamento clínico, induziu uma maior linfoproliferação de PBMC e aumento de TNF- α e NO em seus portadores (**Figura 22**). Esse variante indicou que a resposta Th17 induzida na infecção por *L. (L.) infantum* pode cooperar com a resposta Th1 para uma imunidade protetora contra a LVC.

Recentemente, UTSUNOMIYA et al., 2015 identificaram um SNP no gene *IL15RA* associado com susceptibilidade a LVC. O produto desse gene, a subunidade α do receptor da IL-15 (IL-15R α) foi descrita como reguladora negativa por limitar o desenvolvimento de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17A e IL-17F (COLPITTS; PUDDINGTON; LEFRANÇOIS, 2015). Esses dados corroboram com os nossos achados e reforçam a importância da resposta Th17 para a proteção contra a LVC.

Figura 21 – Gráfico da região do cromossomo 12 mostrando a localização do marcador BICF2P989309, $p = 8,1 \times 10^{-6}$ associado à progressão clínica da LVC

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado a aproximadamente 746 kb dos genes *IL17A* e *IL17F*. O gráfico LD mostra o desequilíbrio de ligação com um SNP próximo ao *IL17A* e *IL17F* ($D' = 0,98$).

Figura 22 – Comparação da progressão clínica, positividade no LPA, nível de TNF- α , Nitrito (NO) entre os genótipos do SNP BICF2P989309 localizado próximo aos genes da *IL-17A* e *IL-17F*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: O alelo A pode ter cooperado para a proteção clínica, linfoproliferação e aumento dos níveis de TNF- α e NO.

6.6 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR À INFECÇÃO NATURAL PELA *L. (L.) infantum*

6.6.1 Correlação parcial entre imunidade celular *in vivo* e *ex vivo*

Com o objetivo de entender como leucócitos circulantes de cães LST positivos e LST negativos respondem ao contato com antígeno específico, nós realizamos o teste da leishmanina (LST) e ensaio de linfoproliferação frente ao antígeno de *L. (L.) infantum* (LPA).

Como esperado, o índice de proliferação de PBMC de cães LST positivos foi maior do que de cães LST negativos ($p \leq 0.05$) (**Figura 23**). No entanto, houve uma correlação positiva fraca entre a área de induração no LST e o índice de proliferação das PBMC estimuladas *ex vivo* com antígeno de *L. (L.) infantum* no LPA ($r = 0,281$; $p \leq 0,05$). Esse dado revelou a possibilidade de haver variação na resposta celular contra a *L. (L.) infantum* em cães LST positivos.

Figura 23 – Comparação do índice de proliferação de PBMC entre cães LST negativos (LST-) e LST positivos (LST+).

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: O box plot indica mediana e distância interquartil. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

6.6.2 Cães infectados naturalmente pela *L. (L.) infantum* respondem de 4 maneiras distintas ao LST e ao LPA

O contato com a *L. (L.) infantum* foi assumido como uma condição crucial para o desenvolvimento de uma imunidade celular específica. Portanto, foram considerados cães não vacinados e não tratados contra LVC, com resultado positivo em pelo menos um dos testes de PCR, LST ou LPA ($n = 100$). Nesse conjunto de cães, foi observada uma concordância entre LST e LPA de 51% (30 LST-/LPA- e 21 LST+/LPA+) e uma discordância de 49% (9 LST+/LPA- and 40 LST-/LPA+). A frequência de cães que apresentaram imunidade celular ativa (LST+ ou LPA+) foi maior (70%) do que a frequência de cães que não apresentaram nenhuma resposta celular (LST-/LPA-) (30%). Entre os cães com imunidade celular ativa, o número de LPA

positivos (61 cães) foi o dobro do número de cães LST positivos (30 cães). Esse dado mostrou que a ativação e proliferação de PBMC não garante que uma reação de hipersensibilidade tardia seja montada na pele (LST). A promoção de uma LST efetiva parece ser um evento complexo que não depende somente da proliferação de linfócitos. Resumidamente, dos 100 cães infectados, 30 (30%) foram LST-/LPA-, 9 (9%) foram LST+/LPA-, 40 (40%) foram LST-/LPA+ e 21 (21%) foram LST+/LPA+. Dezesete cães tiveram resultados negativos nos diagnósticos sorológico e parasitológico e constituíram o grupo controle (CTL) (**Figura 24**).

Figura 24 – Perfis de imunidade celular à infecção natural pela *L. (L.) infantum*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: **LST** indica o número de cães positivos no teste da leishmanina; **LPA** significa o número de cães positivos no ensaio de proliferação de PBMC estimuladas com antígeno de *L. (L.) infantum*; **CTL** significa o número de cães não infectados; **AD** significa o número de cães assintomáticos; **SD** indica o número de cães sintomáticos.

Em análise de regressão multivariada do total de cães avaliados (N = 189), o tamanho da área de induração foi associado com a origem ($p < 0,01$) e com o tratamento anti-LVC ($p < 0,05$) (**Tabela 6**). Já o resultado qualitativo no LPA e o índice de proliferação foram negativamente associados às origens Camaçari – BA ($p < 0,01$) e Presidente Prudente – SP ($p < 0,001$). O índice de proliferação foi também associado à vacina contra LVC ($p < 0,5$) (**Tabela 7**).

Tabela 6 – Análise de regressão multivariada de características não genéticas do hospedeiro na resposta no teste de hipersensibilidade tardia à leishmanina (LST).

Variáveis não genéticas	Resultado no LST		Área de indução	
	Efeito estimado	Valores de <i>p</i>	Efeito estimado	Valores de <i>p</i>
Idade	-0,03919	0,670	-	0,115496
Sexo	0,20171	0,680	-	0,880651
Origem	NS	NS	-	0,002309 **
Coleira repelente	0,42262	0,485	-	0,560317
Vacina LVC	0,73547	0,313	-	0,204788
Tratamento LVC	-0,65683	0,627	-	0,033606 *

Fonte: (BATISTA, 2016).

Nota: NS – não significante; **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

Tabela 7 – Análise de regressão multivariada de características não genéticas do hospedeiro na resposta linfoproliferativa ao antígeno de *L. (L.) infantum* (LPA).

Variáveis não genéticas	Resultado no LPA		Índice de proliferação	
	Efeito estimado	Valores de <i>p</i>	Efeito estimado	Valores de <i>p</i>
Idade	0,04611	0,604495	-	0,79740
Sexo	-0,29847	0,524315	-	0,24956
Origem	-2,50897	0,000539 ***	-	9,569 × 10 ⁻⁸ ***
Coleira repelente	-1,31523	0,083392	-	0,28885
Vacina LVC	-0,71977	0,457547	-	0,02613 *
Tratamento LVC	17,30142	0,989923	-	0,14439

Fonte: (BATISTA, 2016).

Nota: **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

O LST, o LPA e o perfil de citocinas tem sido empregados na avaliação da eficácia de candidatos vacinais (RAFATI et al., 2005; SALDARRIAGA et al., 2006; ROATT et al., 2012), e tem sido aceitos, quando geram resultados positivos, como parâmetros de imunidade celular protetora. Entretanto, o presente estudo demonstrou que há discordância entre o LPA e o LST. Essa discordância nos possibilitou identificar quatro perfis distintos de imunidade celular que foram explorados para aprofundar a caracterização da imunidade celular de cães à infecção natural pela *L. (L.) infantum*.

O grau de positividade do LST em cães de área endêmica pode variar de 16 a 81% e depende majoritariamente do controle genético. Em acordo com os nossos resultados, (DOS-SANTOS et al., 2008; SILVEIRA et al., 2012) observaram grau de positividade no LST que variou de 22 a 29% em populações de cães mestiços de áreas endêmicas no Brasil. Divergentemente, outros estudos realizados na região do Mar Mediterrâneo demonstraram uma frequência de LST positivo chegou a 79% e foi, portanto, superestimada pela inclusão de cães da raça Ibizan hound, tida como particularmente resistente à infecção por *L. (L.) Infantum*. Cães dessa raça exibem alta frequência de resultados positivos no LST em comparação com cães de outras

raças ou cães mestiços (SOLANO-GALLEGO et al., 2000; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2005; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007a). Além da base genética, variáveis ambientais tal como origem, deveriam ser levadas em consideração ao se comparar parâmetros de resistência a *L. (L.) infantum* em populações distintas.

6.6.3 A proliferação de PBMC foi dependente da carga parasitária no linfonodo

O resultado positivo no LST foi predito pelo LPA na maioria dos cães 21/30 (70%), exceto em 9/30 (30%) dos cães LST+/LPA-. Esse mesmo perfil de cães (LST+/LPA-) foi observado em 65% dos cães avaliados por FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2005, incluindo cães da raça Ibiza hound. Interpretações superficiais desses achados dariam conta da possibilidade do LST ocorrer independentemente da ativação de linfócitos T. Entretanto, a supressão da resposta de linfócitos T *ex vivo* nas fases iniciais da infecção já havia sido descrita por (DE LUNA et al., 1999). Outros estudos descreveram supressão da resposta de linfócitos T em cães com LVC sintomática, ou seja, em estágio avançado da infecção (BOGGIATTO et al., 2010; DE ALMEIDA LEAL et al., 2014). Ao comparar a proliferação de PBMC estimulada com antígeno bruto de *L. (L.) infantum* entre cães não infectados (CTL), assintomáticos (AD) e sintomáticos (SD), nós observamos que houve aumento da proliferação em cães assintomáticos ($p < 0,01$) em comparação com cães não infectados e diminuição da proliferação em cães sintomáticos ($p < 0,05$) em comparação com cães assintomáticos (**Figura 25**), o que confirma os achados descritos na literatura (BOGGIATTO et al., 2010; DE ALMEIDA LEAL et al., 2014).

Figura 1 – Nível de proliferação *ex vivo* de PBMC estimuladas por antígeno de *L. (L.) infantum*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: As PBMC foram estimuladas por antígeno de *L. (L.) infantum* por 5 dias e em seguida a proliferação foi quantificada pelo ensaio colorimétrico BrdU. **CTL** indica cães não infectados, **AD** indica cães infectados assintomáticos e **SD** indica cães infectados sintomáticos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (teste não paramétrico de Kruskal – Wallis).

Apesar desse resultado, a não responsividade dos cães LST-/LPA- e LST+/LPA- ao LPA permaneceu inexplicada. Tomando conhecimento de que a carga parasitária no linfonodo foi menor em cães assintomáticos em comparação com os cães sintomáticos (**Figura 17**) que por suas vezes apresentaram menor proliferação de PBMC, nós decidimos avaliar se a não responsividade dos cães LST-/LPA- e LST+/LPA- ao LPA estava relacionada com o parasitismo no linfonodo (PL). Para isso, nós comparamos a carga parasitária e o nível de proliferação dos grupos meio, Leish e ConA nos quatro perfis de imunidade celular e em cães não infectados (CTL). Surpreendentemente, o PL dos cães LPA+ (LST-/LPA+ e LST+/LPA+) variou entre 1,8 e 576 e foi significativamente maior ($p = 0,0004$) do que o de cães LPA- (LST-/LPA- e LST+/LPA-) que variou entre 1,3 e 9 (**Figura 26**). Quando comparada a proliferação das PBMC do grupo Leish em relação ao grupo meio, observamos aumento significativo ($p < 0,001$) apenas nos grupos com maior PL (LST-/LPA+ e LST+/LPA+). Além disso, ao compararmos os grupos Leish entre cães LST-/LPA+ e LST+/LPA+, observamos maior proliferação nos cães LST+/LPA+ ($p < 0,05$). Os cães com baixo parasitismo (LST-/LPA- e LST+/LPA-) e os cães não infectados (CTL) foram não responsivos ao antígeno de *L. (L.) infantum*, embora as PBMC de todos os cães avaliados tivessem forte resposta ao mitógeno inespecífico, ConA quando comparados com o

grupo meio ($p < 0,001$). Esse resultado indica que houve supressão da ativação de linfócitos T induzida pela infecção de *L. (L.) infantum* em baixa carga parasitária.

Figura 26 – Nível de proliferação *ex vivo* de PBMC nos perfis de imunidade celular.

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: As PBMC foram estimuladas por antígeno de *L. (L.) infantum* (Leish) por 5 dias, concanavalina A (ConA) ou somente meio por 72h. Em seguida a proliferação foi quantificada pelo ensaio colorimétrico BrdU. **CTL** indica cães não infectados e **PL** indica parasitismo no linfonodo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (teste paramétrico ANOVA).

A anergia da resposta de células T pode ocorrer por falta de coestimulação no momento da apresentação de antígenos a linfócitos T virgens e essa é uma condição comum de fagócitos que não tenham sido maturados por citocinas pró inflamatórias (JENKINS; MILLER, 1992). A supressão da maturação de fagócitos pode ser induzida pela própria *L. (L.) infantum* nos passos iniciais da infecção, como demonstrado por PINELLI et al., 1999 e por ETTINGER; WILSON, 2008. Portanto, a não responsividade de linfócitos T observada nos cães LST-/LPA- e LST+/LPA- poderia ser coerentemente explicada pela provável escassez de APC maduras e de linfócitos T de memória em condição de baixo parasitismo. Por outro lado, as respostas proliferativas frente ao parasitismo mostraram-se controversas na avaliação dos grupos clínicos em relação a avaliação dos perfis de imunidade. Tal controvérsia indica que outros fatores podem influenciar significativamente a linfoproliferação. Uma análise de associação genômica poderia contribuir para a compreensão dessa resposta.

O fato do LST positivo ter ocorrido mesmo em condição de baixo parasitismo indica que o ambiente *in vivo* apresenta condições necessárias para a maturação de fagócitos que

estão ausentes no meio *in vitro*. No ambiente *in vivo* os fagócitos poderiam amadurecer e se tornar APC aptas a ativar células T virgens.

6.6.4 O perfil de citocinas dos cães LST+/LPA+ foi predominantemente Th1 enquanto cães LST-/LPA+ apresentaram resposta mista entre Th1 e Treg/Th2

Para caracterizar a resposta adaptativa associada aos quatro perfis de imunidade celular, nós quantificamos as concentrações das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β nos sobrenadantes de cultura de PBMC estimuladas com antígeno de *L. (L.) infantum* (Leish) subtraídas das concentrações no grupo meio. A concentração de IFN- γ foi aumentada nos cães LST-/LPA+ ($p < 0,05$) e foi ainda maior nos cães LST+/LPA+ ($p < 0,001$) em relação aos cães do grupo controle. Houve aumento da concentração de IFN- γ nos cães LST+/LPA+ também em relação aos cães LST-/LPA- ($p < 0,001$) (**Figura 27A**). Semelhantemente, a concentração de TNF- α foi maior nos cães LST+/LPA+ ($p < 0,001$) em relação a ambos os perfis LST-/LPA- e do grupo controle (**Figura 27B**). Em relação à IL-4, nós observamos uma supressão significativa da sua liberação em PBMC dos cães LST+/LPA+ ($p < 0,05$) em relação aos cães do grupo controle (**Figura 27C**).

Embora também presentes no perfil LST+/LPA+, as concentrações de IL-10 and TGF- β mostraram-se aumentadas significativamente somente nos cães LST-/LPA+ em relação ao grupo controle e aos cães LST-/LPA-, respectivamente (**Figura 27D**). Apesar da diversidade de citocinas nos sobrenadantes dos cães LPA positivos, o aumento das concentrações de IFN- γ e TNF- α e a supressão de IL-4 apontam para o desencadeamento de uma resposta predominantemente Th1 nos cães LST+/LPA+. É provável que a resposta Th1 nesses cães esteja envolvida com a maior resposta proliferativa de linfócitos em relação aos demais perfis (**Figura 26**). Por outro lado, em cães LST-/LPA+, resposta Th1 foi acompanhada pelo aumento significativo das concentrações das citocinas que participam das respostas Th2/Treg (IL-10 e TGF- β).

Figura 27 – Comparação da concentração de citocinas liberadas no sobrenadante de PBMC estimuladas com antígeno de *L. (L.) infantum* entre os perfis de imunidade celular

(continuação)

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Box plot com mediana e intervalo interquartil das concentrações de IFN- γ (A), TNF- α (B) IL-4 (C), IL-10 (D) e TGF- β (E) nos grupos Leish subtraída pelo grupo meio. LST significa teste da leishmanina, LPA significa ensaio de linfoproliferação, CTL, significa grupo controle. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (teste Kruskal Wallis).

Os primeiros estudos sobre imunidade na LVC demonstraram que resultados positivos de ambos os testes, LST e LPA, estavam associados a cães assintomáticos que apresentavam uma imunidade celular protetora e bem polarizada na resposta Th1 (PINELLI et al., 1994; CARDOSO et al., 1998). Entretanto, os estudos mais recentes vem demonstrando uma resposta mista em que a atividade efetora de linfócitos Th1 é frequentemente regulada pela atividade de subpopulações de linfócitos Th2/Treg (PANARO et al., 2009; MENEZES-SOUZA et al., 2011; DE ALMEIDA LEAL et al., 2014). Nossos achados confirmaram o caráter misto da resposta de PBMC ao antígeno de *L. (L.) infantum* nos perfis LST-/LPA+ e LST+/LPA+,

havendo predominância de conjunto de citocinas Th2/Treg no perfil LST-/LPA+ e predominância de citocinas Th1 no perfil LST+/LPA+.

O aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), e a supressão de IL-4 em cães LST+/LPA+ mostrou que os linfócitos foram primados em um microambiente indutor da diferenciação e proliferação de linfócitos Th1. Enquanto que em cães LST-/LPA+, a ausência de reatividade no LST pode estar relacionada ao aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 and TGF- β).

6.6.5 O perfil LST-/LPA+ foi o mais permissivo à replicação de *L. (L.) infantum*

Com o objetivo de avaliar o papel dos perfis de imunidade celular no controle da infecção por *L. (L.) infantum*, nós quantificamos a carga parasitária em biópsia aspirativa de linfonodo por meio da PCR. Quando comparamos os 4 perfis de imunidade celular, notamos aumento significativo do parasitismo (PL) nos cães LST-/LPA+ em relação aos cães LST-/LPA- ($P < 0,05$) (**Figura 28**). Esse resultado indica que a participação de subpopulações de linfócitos Th2/Treg, evidenciada pelo aumento da produção de IL-10 e TGF- β em cães LST-/LPA+, permitiu o aumento da replicação de *L. (L.) infantum* no linfonodo. Corroborando com esse resultado, outros estudos descreveram a associação de IL-10 e TGF- β com o aumento do parasitismo. ALVES et al., 2009 mostraram que cães sintomáticos apresentaram carga parasitária alta no linfonodo e aumento da expressão de IL-10 e TGF- β . Um padrão semelhante foi também observado na pele, baço e no intestino de cães infectados por MENEZES-SOUZA et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2014; SILVA et al., 2014, respectivamente. Nesses estudos, o aumento de IL-10 foi associado aos linfócitos Treg.

Figura 28 – Aumento da carga parasitária no linfonodo de cães LST-/LPA+

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: A carga parasitária foi quantificada em biópsia aspirativa de linfonodo pela PCR em tempo real quantitativa. * $p < 0,05$ (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

6.6.6 Os perfis de imunidade celular foram clinicamente heterogêneos

Afim de investigar o papel da imunidade celular na determinação da resposta clínica à infecção pela *L. (L.) infantum*, nós avaliamos a frequência de casos sintomáticos e assintomáticos nos 4 perfis de imunidade celular. Dos 30 cães LST-/LPA-, 11 foram assintomáticos e 19 sintomáticos, sendo que os cães assintomáticos desse perfil podem estar em estágio inicial de infecção e portanto não exibem qualquer resposta imune celular, enquanto que os cães sintomáticos podem representar uma condição anérgica da imunidade celular contra a *L. (L.) infantum*. No perfil LST+/LPA- 6 cães foram assintomáticos e 3 foram sintomáticos, já no perfil LST-/LPA+, 23 cães foram assintomáticos e 17 sintomáticos e no perfil LST+/LPA+, 12 cães foram assintomáticos e 9 foram sintomáticos. Esses achados mostraram que nenhum dos perfis de imunidade celular foi capaz de garantir proteção contra a manifestação de sintomas nos cães. A distribuição dos perfis clínicos dentre os perfis de imunidade foi demonstrado na **Figura 24**.

O resultados LST+ em cães sintomáticos vem sendo descrito por outros autores (PINELLI et al., 1994; DOS-SANTOS et al., 2008; SILVEIRA et al., 2012). No presente estudo, 12

dos 30 cães LST positivos (40%) apresentaram sintomas, indicando que até mesmo cães com perfil de imunidade tida como protetora por promover o controle do parasitismo (Th1) podem apresentar sintomas. É provável que esses sintomas sejam associados ao excesso de imunoestimulação. Apesar de tudo, apenas 8,3% (1/12) dos cães sintomáticos LST+ apresentaram doença severa (V). Em relação aos cães LST-, 19,4% (7/36) apresentaram doença severa (V). Esse resultado mostra um certo grau de prevenção contra o agravamento em cães LST+ e sugere que o excesso de regulação, permissiva ao aumento da carga parasitária em cães LST-, seja mais favorável ao agravamento clínico do que os sintomas causados pelo excesso de resposta inflamatória.

Juntos, esses achados apontam para a complexidade dos fatores envolvidos na patogenia da LVC que inclui desde manifestação de sintomas decorrentes da disseminação do parasito por excesso de imunoregulação (MENEZES-SOUZA et al., 2011), até alterações histopatológicas causadas pela exacerbação da resposta inflamatória consequente do excesso de imunoativação (DE ALMEIDA LEAL et al., 2014; SOUZA et al., 2014). Os relatos recentes da participação da resposta Th17 na resposta imune da LVC corroboram com esses achados (NASCIMENTO et al., 2015a). A resposta Th17 coopera com a resposta Th1 no controle da infecção, porém é também associada ao recrutamento de neutrófilos, liberação de mediadores inflamatórios e exacerbação de doenças inflamatórias como a artrite reumatoide (YAMAGUCHI et al., 2007; LITTMAN; RUDENSKY, 2010; SACRAMENTO et al., 2014).

O efeito pleiotrópico e antagônico da resposta imune pode estar relacionado às mudanças sofridas ao longo da evolução da espécie canina. BOYKO, 2011 discute que os cães têm coabitado os meios alimentícios e patogênicos do homem durante a troca de um estilo de vida de caça para a prática da agricultura e que algumas adaptações humanas a essas mudanças ambientais bruscas podem ter evoluído em paralelo em cães, tal como a aquisição de um sistema imune altamente reativo que protege de infecções, mas que predispõe os indivíduos às doenças autoimunes. A relação entre evolução e hiperresponsividade vem sendo defendida tanto para humanos quanto para animais (NGUYEN et al., 2006; GRAHAM et al., 2010).

6.7 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA À IMUNIDADE CELULAR

Foram realizadas análises de associação genômica para o resultado no teste da leishmanina (status no LST), tamanho da área de induração no LST (Induração), resultado no ensaio de linfoproliferação (status no LPA) e índice de proliferação de PBMC no LPA (Índice de proliferação) com o objetivo de identificar marcadores genômicos associados a esses parâmetros e como meio de identificar genes com potencial de afetar a resposta imune celular à infecção pela *L. (L.) infantum*.

6.7.1 Associação genômica ao resultado no LST (qualitativo)

Dentre os cães amostrados, 10 (5,3%) foram LST+ e PCR-, o que indica que o LST pode guardar alguma memória imunológica em cães negativos no teste parasitológico. Portanto, nessa análise foram testados 179 cães que passaram por todos os filtros, sendo 36 LST+ e 143 LST-, independente do resultado na PCR. O fator de inflação foi igual a um, indicando o controle dos efeitos da estrutura da população sobre a associação. Quatro marcadores foram significativos (**Figura 29**).

Figura 29 – A análise de associação genômica identificou 4 marcadores associados ao status no LST ($p < 10^{-5}$) nos cromossomos 7, 11 e 23.

Fonte: (BATISTA, 2016).

No cromossomo 7 dois SNPs foram significativos. O SNP BICF2P161375, $p = 5,94 \times 10^{-6}$, localizado na posição 60.437.942 e o SNP BICF2P650503, $p = 2,37 \times 10^{-6}$, localizado na posição 77.204.787. O SNP BICF2P161375, cujo alelo B apresentou frequência de 26,4% nos cães LST+ e 6,8% nos cães LST-, teve uma odds ratio estimada em $4,93 \pm 3,77$ e está localizado

no gene *MEP1B* (**Figura 30**). *MEP1B* codifica a metaloproteinase Meprina- β . Essa enzima ativa as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-18 em macrófagos (LI et al., 2014) e é importante para a disseminação de leucócitos na matriz extracelular (CRISMAN et al., 2004). Nos cães amostrados, o alelo B foi associado a LST positivo e com o aumento de IFN- γ e TNF- α (**Figura 31**). Esses achados indicam uma associação do alelo B com a indução de Meprina- β . Devido ao papel dessa metaloproteinase em ativar citocinas da imunidade inata, é provável que o alelo B esteja envolvido na manutenção do ambiente pró inflamatório requerido para a maturação de fagócitos e consequente indução da resposta Th1 observada em cães LST+/LPA+.

Figura 30 – Gráfico da região do cromossomo 7 mostrando a localização do marcador BICF2P161375, $p = 5,94 \times 10^{-6}$ associado ao resultado no LST. SNP localizado no gene *MEP1B*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Figura 31 – Comparação da proporção de cães LST+, IFN- γ e TNF- α entre os genótipos dos SNPs BICF2P161375 localizado no gene *MEP1B*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo B com o LST positivo e aumento dos níveis de IFN- γ e TNF- α .

Ainda no cromossomo 7, o marcador BICF2P650503, $p = 2,37 \times 10^{-6}$ está localizado na posição 77.204.787. O seu alelo B teve uma frequência de 18% nos cães LST+ e de 2,98%

nos cães LST-, uma odds ratio estimada em $7,17 \pm 14,62$ e está localizado no gene *PTPRM* (Figura 32). Esse gene codifica a proteína tirosina fosfatase (PTPμ) envolvida na regulação da adesão célula a célula mediada por caderina em leucócitos, sobretudo na adesão a células endoteliais em humanos (BIANCHI et al., 1999; HELLBERG et al., 2002), além de ser importante para a dilatação arterial induzida pelo fluxo sanguíneo (KOOP et al., 2005) e possuir atividade catalítica intracelular regulada pelo H_2O_2 (GROEN et al., 2008). Nos cães amostrados, o alelo B foi associado ao LST positivo e com o aumento da área de induração no LST (Figura 33). Esse dado sugere que o alelo B pode estar envolvido na ativação de *PTPRM* uma vez que a adesão de leucócitos a células endoteliais é um passo importante para que leucócitos realizem diapedese e alcancem o sítio de inoculação da leishmanina na derme.

Figura 32 – Gráfico da região do cromossomo 7 mostrando a localização do marcador BICF2P650503, $p = 2,37 \times 10^{-6}$ no gene *PTPRM* (ENSCAFG00000023271) associado ao resultado do LST. SNP localizado no gene *PTPRM*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Figura 33 – Comparação da proporção de cães LST+ e do tamanho da área de induração entre os genótipos do SNP BICF2P650503 localizado no gene *PTPRM*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo B com o LST positivo e aumento da área de induração.

No cromossomo 11, o SNP BICF2P736708, apresentou nível de significância de $p = 1,14 \times 10^{-6}$ e está localizado na posição 55.462.240. O alelo A teve frequência de 25% nos cães

LST+ e de 10% nos cães LST- e uma odds ratio de $3 \pm 1,79$. Esse marcador está localizado em um locus localizado a aproximadamente 3,8 Mb do gene *TGFB1* que codifica o receptor *TGFB1* do TGF- β . A sinalização do TGF- β leva à supressão celular por inibir a fase G1 do ciclo celular e pode induzir a diferenciação de clones de células Treg ou Th17 (LITTMAN; RUDENSKY, 2010). Em uma localização mais próxima (a aproximadamente 180 kb) e em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,74$) com um SNP vizinho ao SNP em questão, encontra-se o gene *TLN1* (**Figura 34**), que codifica a proteína do citoesqueleto Talina 1. A Talina 1 liga a subunidade β de integrinas e localiza-se na região de contato das células ao meio extracelular ou a outra célula (HYDUK et al., 2011). Por exemplo, a talina está concentrada no complexo supramolecular periférico (pSMAC) de linfócitos T durante a sinapse imunológica (SI) onde se liga à porção intracelular da integrina LFA-1 e a outras moléculas de citoesqueleto do linfócito T. A LFA-1 liga-se à integrina ICAM-1 de células endoteliais durante a migração do linfócito T ou à ICAM-1 e ICAM-2 de APC durante a SI. Essa ligação confere estabilidade à sinapse imunológica (SI), sendo que o balanço entre sua formação e sua quebra é crucial para o equilíbrio entre simetria e assimetria durante a SI. A SI de células comprometidas com a diferenciação de Th1 é hiperestável, enquanto que SI em células comprometidas com Th2 acontece em condição de instabilidade (MARSLAND et al., 2004; TRIFARI et al., 2006; SIMS et al., 2007). No estudo presente, o alelo A foi associado com o aumento sutil da proporção de cães LST positivos, aumento da área de induração no LST, aumento de IFN- γ e TNF- α (em heterozigose), além de ser associado com o aumento de IL-10 e com uma leve supressão da resposta proliferativa de PBMC (**Figura 25**).

O marcador BICF2P736708 revelou uma região que é provavelmente intensamente regulada durante a resposta adaptativa, sobretudo na decisão da subpopulação de células T que será gerada após a SI. É provável que essa região esteja envolvida na expressão de imunidade mista observada nos perfis LST-/LPA+ e LST+/LPA (**Figura 23**).

Figura 34 – Gráficos da região do cromossomo 11 mostrando a localização do marcador BICF2P736708, $p = 1,14 \times 10^{-6}$ associado ao resultado no LST

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado a aproximadamente 180 Kb do gene *TLN1* e a 3,8 Mb do gene *TGFBR1*. Gráfico LD mostra desequilíbrio de ligação ($D' = 0,74$) com um SNP próximo ao gene *TLN1*.

Figura 35 – Comparação da proporção de cães LST+ e do tamanho da área de induração entre os genótipos do SNP BICF2P736708 localizado a 180 kb do gene *TLN1*.

Fonte: (BATISTA, 2015).

Legenda: Associação do alelo A com maior proporção de cães LST positivo, aumento da área de induração, aumento de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e supressão da proliferação de PBMC.

O SNP BICF2P506643, $p = 1,22 \times 10^{-5}$, localizado na posição 10.472.374 do cromossomo 23. O alelo A apresentou uma odds ratio estimada em $3,85 \pm 3,46$ e frequência de 16,6% nos cães LST+ e de 4,9% nos cães LST-. Esse SNP pertence ao gene *ITGA9* (Figura 36)

que codifica a cadeia alpha 9 de uma integrina que quando ligada à cadeia $\beta 1$ forma uma integrina receptora para VCAM1, osteopontina e citotactina. Essa integrina está implicada na saída de linfócitos do linfonodo satélite e na quimiotaxia de macrófagos (GUPTA; VLAHAKIS, 2009; ITO et al., 2014), eventos cruciais para a migração de linfócitos e macrófagos para a área de inoculação da leishmanina. Nos cães testados, o alelo A foi associado a LST positiva e aumento da área de induração (Figura 37), sugerindo que esse alelo possa induzir a atividade da Integrina $\alpha 9$.

Figura 36 – Gráfico da região do cromossomo 23 mostrando a localização do marcador BICF2P506643, $p = 1,22 \times 10^{-5}$ associado ao resultado do LST. SNP localizado no gene *ITGA9*.

Fonte: (BATISTA, 2015).

Figura 37 – Comparação da proporção de cães LST+ e do tamanho da área de induração entre os genótipos do SNP BICF2P506643 localizado no gene *ITGA9*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Aumento da proporção de resultado positivo no LST e aumento da área de induração entre cães portadores do alelo A.

Em acordo com os nossos achados, JERONIMO et al., 2007b em um estudo em humanos identificaram SNPs nos genes *TGFB1* e *LECT2* associados ao fenótipo LST+; uma região localizada entre *TGFB1* e *LECT2* e SNPs no gene *IL4* associados ao fenótipo LST- (Figura

3). FRADE et al., 2011 também em humanos observaram associação de SNP no gene *TGFB1* com o fenótipo LST-. O gene correspondente por ortologia ao *TGFB1* no cão encontra-se no cromossomo 7, em um locus (70.039.942 – 70.048.346) que está entre os SNP BICF2P161375 e BICF2P650503 identificados como significantes em nosso estudo. Os genes *IL4* e do *LECT2*, correspondentes por ortologia no cão, encontram-se no cromossomo 11, na vizinhança de onde nós identificamos o SNP BICF2P736708. Esses achados demonstram a replicação de duas regiões anteriormente descritas, o que evidencia a importância dessas regiões gênicas para a resposta ao LST, independente da espécie do hospedeiro.

6.7.2 Associação genômica ao tamanho da área de induração no LST (quantitativo)

Nessa análise foram testadas 50 amostras. O fator de inflação foi de aproximadamente um, indicando o controle dos efeitos da estrutura da população sobre a associação. Apenas um marcador foi significativo no cromossomo 10 (**Figura 38**).

Figura 38 – A análise de associação genômica identificou um marcador associado ao tamanho da área de induração no LST ($p < 10^{-5}$) no cromossomo 10

Fonte: (BATISTA, 2015).

O SNP BICF2G630490347, $p = 7,31 \times 10^{-7}$, localiza-se na posição 53.489.836 do cromossomo 10. O alelo A apresentou frequência de 43% na amostra testada. Esse SNP pertence ao gene *KLRAQ1* homólogo do gene *PPP1R21* que codifica a subunidade regulatória 21 da proteína fosfatase 1 (**Figura 39**). Nessa mesma região, a aproximadamente 870 kb e em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,576$) com o SNP BICF2G630490347 encontra-se o gene *EPCAM*. A proteína de adesão epitelial codificada por esse gene está envolvida em adesão, migração de leucócitos e participa da indução da proliferação durante a inflamação (MÜNZ et al., 2004; SUMAGIN; PARKOS, 2015). Na vizinhança do *EPCAM* encontra-se o gene *CALM2* que codifica

a proteína calmodulina indutora de proliferação celular dependente de cálcio (COLOMBANI; ROBB; HESS, 1985). Nos cães amostrados, o alelo A foi associado ao aumento da área de induração e com o aumento discreto do índice de proliferação de PBMC (**Figura 40**) o que indica que esse variante pode ser um reforço importante para a migração, adesão e proliferação dos leucócitos que promovem o LST.

Figura 39 – Gráfico da região do cromossomo 10 mostrando a localização do marcador BICF2G630490347, $p = 7,31 \times 10^{-7}$ associado ao tamanho da área de induração no LST

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado a aproximadamente a 870 Kb dos genes *EPCAM* e *CALM2*. O gráfico LD mostra o desequilíbrio de ligação ($D' = 0,576$) com um SNP próximo ao *EPCAM* e *CALM2*.

Figura 40 – Comparação do tamanho da área de induração no LST entre os genótipos do SNP BICF2G630490347 localizado próximo aos genes *EPCAM* e *CALM2*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo A com o aumento da área de induração e com o aumento discreto da proliferação de PBMC.

6.7.3 Associação genômica ao resultado qualitativo do ensaio de proliferação (LPA)

Dentre os cães amostrados, 15 (8%) foram LPA+ e PCR-, o que indica que o LPA pode guardar alguma memória imunológica. Portanto nessa análise foram testadas amostras de 126 cães, 67 LPA positivos e 59 LPA negativos, independente do resultado na PCR. O fator de inflação foi aproximadamente um, mostrando o controle dos efeitos da estrutura da população sobre a associação. Foram identificados dois SNPs significativos nos cromossomos 7 e 11 a depender do modelo utilizado (**Figura 41**).

Figura 2 – A análise de associação genômica identificou dois marcadores associados ao status no LPA ($p < 10^{-5}$) nos cromossomo 7 e 11

Fonte: (BATISTA, 2016).

O SNP BICF2P1209884, $p = 3,4 \times 10^{-6}$, está localizado na posição 43.350.122 do cromossomo 11. O alelo A apresentou uma frequência de 1,5% nos cães LPA+ e de 8,1% nos cães LPA- com uma odds ratio estimada em $0,17 \pm 0,42$. Esse marcador está localizado no gene *KIAA1797/FOCAD* que codifica a proteína de adesão Focadesina (**Figura 42**). Essa proteína é um potente supressor de tumor (WEREN et al., 2015). Nos cães amostrados, o alelo A foi associado ao status LPA negativo, o que indica que o alelo A pode estar envolvido na ativação da expressão da focadesina suprimindo a proliferação de PBMC (**Figura 43**).

Figura 42 – Gráfico da região do cromossomo 11 mostrando a localização do marcador BICF2P1209884, $p = 3,4 \times 10^{-6}$ associado ao status no LPA. SNP localizado no gene *KIAA1797/FOCAD*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Figura 43 – Comparação da proporção de cães LPA positivos entre os genótipos do SNP BICF2P1209884 localizado no gene *KIAA1797/FOCAD*

Fonte: (BATISTA, 2015).

Legenda: Associação do alelo A com o resultado negativo no LPA.

O SNP BICF2P826452, $p = 2,75 \times 10^{-6}$, localizado na posição 47.582.500 do cromossomo 7 mostrou-se acima do limiar de significância quando o tratamento anti-LVC foi incluído no modelo. O seu alelo B apresentou frequência de 71,9% nos cães LPA+ e 48,6% nos

cães LPA- e um efeito estimado de $0,39 \pm 0,21$. Esse SNP está localizado na vizinhança do gene *PIAS2* (**Figura 44**) que codifica a proteína inibidora do fator de transcrição STAT (PIAS). A PIAS tem a função de regular vias de sinalização como a via STAT (importante na diferenciação Th1/Th2), via de supressão tumoral da p53 e de sinalização de hormônios esteróides (SCHMIDT; MÜLLER, 2002). Trata-se de uma região cromossômica provavelmente regulada intensamente durante a ativação de linfócitos T virgens, por estar na vizinhança dos genes *IL6R* e *SMAD2* (**Figura 44**). O modulador transcricional e transdutor de sinal SMAD2 é induzido pela ligação do TGF- β ao seu receptor. Já a citocina próinflamatória IL-6 (ligante do receptor IL-6R) e a citocina supressora TGF- β , juntas induzem a diferenciação das células Th17 produtoras de IL-17 e IL-22 (BETTELLI et al., 2006; MCGEACHY et al., 2007). Quando deflagradas em conjunto, as cadeias de sinalização do TGF- β e do IL-6, ocorre expansão de clones de Th17, porém quando deflagrada sozinha a sinalização do TGF- β induz a diferenciação de clones de Treg (LITTMAN; RUDENSKY, 2010). Aqui, nós observamos uma associação do alelo B com resultado positivo no LPA e com o aumento de nível de IFN- γ , TNF- α e IL-10 em cultura de PBMC estimulada por antígeno de *L. (L.) infantum* (**Figura 45**), o que sugere falha da função da PIAS.

Na **Figura 27**, nós demonstramos que os cães LPA+ apresentaram um perfil misto de citocinas liberadas no sobrenadante de cultura de PBMC estimuladas com antígeno de *L. (L.) infantum*, porém com predominância de citocinas Th1 ou Treg a depender do resultado no LST. PBMC de cães LST-/LPA+ produziram maiores níveis de IL-10 e TGF- β enquanto PBMC de cães LST+/LPA+ produziram maiores níveis de IFN- γ e TNF- α . É provável que a região cromossômica evidenciada pelo marcador BICF2P826452 esteja sob regulação das citocinas contextualizadas no momento da ativação de células T virgens e que o teor de citocinas que compõem esse microambiente nos cães LST+ seja predominantemente do conjunto das citocinas pró inflamatórias, por exemplo IL-6. Esse contexto induz a diferenciação de linfócitos Th17 cuja resposta é a produção de IL-17, IL-22 que cooperam com a resposta Th1, como já demonstrado na LV no homem e no cão (PITTA et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2015a), respectivamente. Já nos cães LST-, é provável que haja predominância de TGF- β e indução da diferenciação de células Treg.

Figura 44 – Gráfico da região do cromossomo 7 mostrando a localização do marcador BICF2P826452, $p = 2,47 \times 10^{-5}$ associado com o status no LPA

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado nas proximidades dos genes *PIAS2*, *IL6R* e *SMAD2*. Gráfico LD mostrando desequilíbrio de ligação ($D' = 0,66$) com um SNP no *PIAS2*.

Figura 45 – Comparação da proporção de cães LPA positivos, dos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β entre os genótipos do SNP BICF2P826452 localizado nas proximidades dos genes *PIAS2*, *IL6R* e *SMAD2*.

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo B com o resultado positivo no LPA e aumento de IFN-g, TNF-a, IL-10.

6.7.4 Associação genômica ao índice de proliferação de PBMC

Para esse GWAS, foram utilizadas 121 amostras de cães de área endêmica testados no LPA. O fator de inflação foi de aproximadamente um, indicando o controle da influência das variáveis poligênicas resultantes da estrutura da população. Nessa análise, nenhum marcador significativamente associado foi identificado. Esse resultado reforça a idéia de que a resposta proliferativa de linfócitos T sofre forte regulação pela interação entre a *L. (L.) infantum* e o hospedeiro, como demonstrado na **Figura 26**. Por outro lado, o poder estatístico dessa análise merece ser melhor averiguado.

6.8 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE HUMORAL À INFECÇÃO POR *L. (L.) infantum*

Afim de avaliar a resposta humoral em relação à progressão clínica da LVC, nós quantificamos os níveis de IgM, IgG, IgA e IgE específicas contra *L. (L.) infantum* em soro de 165 classificados quanto à progressão clínica (**Tabela 3**).

6.8.1 Resposta de IgM anti-*L. (L.) infantum*

Os níveis de IgM foram sutilmente elevados em cães expostos (II) e sutilmente reduzidos em cães severamente doentes (V), porém, sem diferença estatisticamente significativa (**Figura 46**). De forma semelhante, outros pesquisadores observaram níveis equiparáveis de IgM entre cães sintomáticos e assintomáticos e tendência de diminuição em cães sintomáticos (REIS et al., 2006; DE FREITAS et al., 2012).

Figura 46 – Níveis de IgM em soro de cães de área endêmica segundo a progressão clínica.

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: I - cães não infectados, II - cães expostos, III - cães infectados, IV - cães doentes e V - cães severamente doentes. Box plot representa medianas e intervalos interquartis das Unidades de ELISA.

Em análise de regressão linear, os níveis de IgM foram associados ao sexo ($p < 0,05$), idade ($p < 0,001$), ao uso de coleira repelente ($p < 0,001$) e à origem do cão ($p < 0,001$) (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Análise de regressão multivariada de características não genéticas do hospedeiro na imunidade humoral à infecção natural pela *L. (L.) infantum*

Variáveis não genéticas	IgM	IgG	IgA	IgE
	Valores de p	Valores de p	Valores de p	Valores de p
Idade	$8,417 \times 10^{-5}$ ***	0,4073	0,801454	0,004507 **
Sexo	0,0339853 *	0,4774	0,696977	0,498637
Origem	$4,283 \times 10^{-4}$ ***	$8,982 \times 10^{-7}$ ***	$8,384 \times 10^{-6}$ ***	$5,809 \times 10^{-6}$ ***
Coleira repelente	$3,296 \times 10^{-4}$ ***	0,6938	0,215503	0,373443
Vacina LVC	0,9350472	$1,513 \times 10^{-11}$ ***	0,289898	0,797508
Tratamento LVC	0,0624530	$5,251 \times 10^{-10}$ ***	0,001106 **	0,119878

Fonte: (BATISTA, 2016).

Nota: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A IgM é a primeira imunoglobulina secretada por linfócitos B ativados e não depende do auxílio de linfócitos T para ser secretada (timo independente), por conta disso os maiores níveis de IgM são observados na fase aguda da infecção, antes das células B sofrerem troca de classe, o que justifica a detecção dos maiores níveis nos cães expostos (II) em comparação aos demais cães avaliados no estudo. Essa imunoglobulina é encontrada na corrente sanguínea, onde pode ativar a via clássica do sistema complemento, ou ser depositada nos rins. No

plasma, a IgM representa menos de 10% das imunoglobulinas, embora apresente o maior peso molecular por circular na forma pentamérica (SOARES; MORAES; MORAES, 2009; MURPHY 2012).

6.8.2 Associação genômica à resposta de IgM anti-*L. (L.) infantum*

Na análise de associação genômica para os níveis de IgM foram testadas 165 amostras. O valor do fator de inflação foi de aproximadamente um, indicando controle dos efeitos de estrutura da população na associação. Dois marcadores foram significativamente associados à IgM e mantiveram nível de significância em todos os modelos testados (1×10^{-5}), (Figura 47).

Figura 47 – A análise de associação genômica identificou dois marcadores associados aos níveis de IgM anti-*L. (L.) infantum* ($p < 10^{-5}$) nos cromossomos 9 e 23 em cães de área endêmica.

Fonte: (BATISTA, 2016).

O marcador BICF2P397161, $p = 6,13 \times 10^{-6}$, localizado na posição 48.301.319 do cromossomo 9. O alelo A apresentou uma frequência de aproximadamente 5% na amostra estudada e está localizado no gene *NXN* (Figura 48) que codifica a proteína nucleoredoxina (NRX), da família das oxidoredutases tioredoxinas conhecidas por regular negativamente a via Wnt/ β -Catenina em uma maneira dependente de ROS. Essa via é importante no crescimento, proliferação e diferenciação celular (FUNATO; MIKI, 2007). Foi demonstrado que a nucleoredoxina regula negativamente a via TLR4/MyD88 importante na imunidade inata, que é envolvida em muitas funções, incluindo o aumento dos níveis de imunoglobulinas (HAYASHI et al., 2010). Curiosamente, a NRX possui alta similaridade com a Tryparedoxina (TryX), uma

tioreordoxina de tripanossomatídeos (FUNATO; MIKI, 2007). Aqui, o alelo A foi associado ao aumento de IgM (**Figura 49**), o que sugere bloqueio do *NXN*.

Figura 48 – Região do cromossomo 9 em que está localizado o marcador BICF2P397161, $p = 6,13 \times 10^{-6}$, associado aos níveis de IgM anti-L. (*L.*) infantum. SNP localizado no gene *NXN*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Figura 49 – Comparação dos níveis de IgM anti-L. (*L.*) infantum entre os genótipos do SNP BICF2P397161 posicionado no gene *NXN*. Associação do alelo A com o aumento dos níveis de IgM anti-L. (*L.*) infantum

Fonte: (BATISTA, 2016).

O segundo marcador associado à IgM foi o BICF2P1333073, $p = 3,96 \times 10^{-6}$, localizado na posição 30.383.100 do cromossomo 23. A frequência do alelo A na amostra estudada foi de 5,4%. O SNP identificado está localizado no gene *SH3BP5* (**Figura50**) que codifica a proteína adaptadora de ligação ao domínio SH3 da Tirosina Quinase de Agamaglobulinemia de Bruton (Btk). A *SH3BP5* inibe a ativação da (Btk) por inibir suas auto e transfosforilação. A Btk é crucial para o crescimento, ativação e diferenciação de células da linhagem mieloide, linfócitos B e para o rearranjo da cadeia pesada das imunoglobulinas (MATSUSHITA et al., 1998; YAMADORI

et al., 1999; MOHAMED et al., 2009). Uma mutação no gene *BTK* causa uma imunodeficiência específica da resposta de IgM em humanos (LIM et al., 2013). Além disso, Btk regula positivamente a produção de citocinas pro inflamatórias induzida pelo receptor do tipo toll (TLR9) (LEE et al., 2008). Em nosso estudo, o alelo A do SNP BICF2P1333073 do *SH3BP5* foi associado ao aumento crítico dos níveis de IgM, IgG, IgA, (**Figura 51**) indicando que o alelo A pode ser inibitório para o gene *SH3BP5*. Além disso, o alelo A também foi associado ao aumento da concentração de TNF- α e IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC estimulada com antígeno de *L. (L.) infantum*. Entretanto, conclusões adicionais devem considerar que cerca de 30% dos cães homozigotos (BB) e 20% dos cães heterozigotos (AB) foram negativos na PCR, enquanto 100% dos cães AA foram positivos na PCR, o que pode estar influenciando parâmetros de imunidade apresentados.

Figura 50 – Gráfico da região do cromossomo 23 de localização do marcador BICF2P1333073, $p = 3,96 \times 10^{-6}$ associado aos níveis de IgM anti-*L. (L.) infantum*. SNP localizado no gene *SH3BP5*

Fonte: (BATISTA, 2015).

Figura 51 – Comparação dos níveis de imunoglobulinas e citocinas pró inflamatórias entre os genótipos do SNP BICF2P1333073, posicionado no gene *SH3BP5*

Fonte: (BATISTA, 2015).

Legenda: Relação do alelo A com o aumento dos níveis de imunoglobulinas e citocinas pró inflamatórias.

6.8.3 Resposta de IgG anti-*L. (L.) infantum*

Os níveis de IgG foram maiores nos cães severamente doentes (V) em comparação aos cães não infectados (I) e infectados (III) ($p \leq 0,001$) e doentes (IV) ($p \leq 0,05$); nos cães doentes (IV) em comparação ao cães não infectados (I) ($p \leq 0,001$) e infectados (III) ($p \leq 0,01$) e nos cães expostos (II) em comparação com os cães não infectados (I) ($p \leq 0,05$), (**Figura 52**). Em análise de regressão linear os níveis de IgG foram associados com a vacinação anti-LVC ($p < 0,001$), com o tratamento anti-LVC ($p < 0,001$) e à origem dos cães ($p < 0,001$) (**Tabela 8**).

Figura 52 – Níveis de IgG em soro de cães de área endêmica segundo a progressão clínica

Fonte: (BATISTA, 2012).

Legenda: I - cães não infectados, II - cães expostos, III - cães infectados, IV - cães doentes e V - cães severamente doentes. Box plot representa medianas e intervalos interquartis das Unidades de ELISA. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

A IgG é a imunoglobulina mais abundante no soro, onde pode ativar a via clássica do sistema completo, além de ser a imunoglobulina que permanece por mais tempo em circulação antes de ser degradada, o que pode justificar os seus altos níveis no soro. Os níveis de todas as subclasses de IgG aumentam com o agravamento clínico da LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2001b; INIESTA; GÁLLEGO; PORTÚS, 2005). Dentre as duas subclasses mais

estudadas na LVC (IgG1 e IgG2), a IgG1 é a mais abundante e pode ligar os receptores de Fc (FcR) presentes em fagócitos como macrófagos e em podócitos que fazem internalização e degradação dessa imunoglobulina. A produção de IgG1 acontece quando linfócitos B são influenciados pela IL-4 liberada por linfócitos Th2 ou por linfócitos T auxiliares foliculares (T_{FH}) nos tecidos linfóides (MURPHY 2012). Nesse estudo, a liberação de IL-4 pelas PBMC estimuladas com Ag de *L. (L.) infantum*, em níveis detectáveis, foi notada apenas em cães expostos (II) os quais apresentaram aumento de IgG em relação a cães não infectados (I), (**Figura 53**). De maneira semelhante, BARBOSA et al., 2011 observaram aumento da expressão de IL-4 em PBMC de cães assintomáticos. Esse resultado sugere que a IgG1 esteja envolvida no aumento de IgG total em cães expostos. Outros pesquisadores mostraram que durante estágios mais avançado da infecção, a IL-4 foi detectada em outros tecidos como baço e linfonodo mas não no sangue (STRAUSS-AYALI; BANETH; JAFFE, 2007; BARBOSA et al., 2011).

Nos cães avaliados em nosso estudo, os níveis de IgG total foram positivamente correlacionados com a carga parasitária no linfonodo ($r = 0,507$; $p < 0,001$). Corroborando com esse achado, outros estudos do campo da imunidade humoral também mostraram que o aumento do nível de IgG total e das subclasses de IgG é correlacionado com o aumento da carga parasitária, com excessão da IgG2 (QUINNELL et al., 2003a; REIS et al., 2006; CARSON et al., 2010). Para que ocorra a troca de classe de IgM para IgG2, é necessário que a célula B receba a influência do IFN- γ liberado por linfócitos Th1, TCD8⁺ ou T_{FH} (MURPHY 2012). Quando comparados, os níveis de imunoglobulinas entre os perfis de imunidade celular, surpreendentemente, os maiores níveis de IgG total foram notados em cães do perfil LST+/LPA+ que havia sido associado aos altos níveis de IFN- γ e TNF- α (**Figura 54**). De fato houve correlação positiva entre níveis de IgG total e níveis de IFN- γ ($r = 0,430$; $p < 0,001$), o que sugere aumento de IgG2 nesse perfil. Demais estudos serão necessários para investigar os níveis de cada subclasse nesses perfis. Além disso, o aumento dos níveis de IgG no perfil LST+/LPA+ também pode estar envolvido na incidência de manifestação de sintomas em cães LST+, uma vez que parte da patogenia da LVC é mediada pela deposição imunoglobulinas nos tecidos (NIETO et al., 1992; SOARES; MORAES; MORAES, 2009; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

Figura 53– Níveis de IL-4 em sobrenadante de cultura de PBMC segundo a progressão clínica

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: I - cães não infectados, II - cães expostos, III - cães infectados, IV - cães doentes e V - cães severamente doentes. Box plot representa medianas e intervalos interquartis das diferenças entre os grupos Leish e meio.

Figura 54 – Níveis de IgG em soro de cães de área endêmica segundo perfis de imunidade celular

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: LST indica o número de cães positivos no teste da leishmanina; LPA significa o número de cães positivos no ensaio de proliferação de PBMC estimuladas com antígeno de *L. (L.) infantum*; CTL significa o número de cães não infectados. Box plot representa medianas e intervalos interquartis das Unidades de ELISA.

* $p \leq 0,05$ (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

6.8.4 Associação genômica à resposta de IgG anti-*L. (L.) infantum*

Foram testadas amostras de 165 cães. O fator de inflação foi de aproximadamente 1, indicando ajuste apropriado para potenciais efeitos de estrutura da população na associação. Três marcadores foram significativos ($p < 10^{-5}$) (**Figura 55**). Por ter causado aumento do fator de inflação (1,47) o tratamento contra LVC não foi incluído no modelo.

Figura 55 – A análise de associação genômica identificou três marcadores associados aos níveis de IgG anti-*L. (L.) infantum* ($p < 10^{-5}$) nos cromossomos 20, 21 e 26 de cães de área endêmica

Fonte: (BATISTA, 2016).

O marcador BICF2P611903, $p = 5,03 \times 10^{-6}$ está localizado na posição 39.083.622 do cromossomo 20. O alelo B apresentou frequência de 18% na amostragem testada. O marcador em questão está localizado a aproximadamente 49 kb do gene *IL17RB* (**Figura 56**) que codifica o receptor da IL-17B e IL-17E, cujos ligantes induzem o aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-23 por macrófagos e exacerbação da inflamação na artrite em camundongos (YAMAGUCHI et al., 2007). Nesse estudo, o alelo B foi associado à diminuição do nível de IgG anti-*L. (L.) infantum*, de TNF- α , NO e índice de proliferação (**Figura 57**). Esse achado sugere uma provável associação do alelo B com o bloqueio do receptor da IL-17B e por consequência, bloqueio da cooperação da IL-17 com a resposta Th1, levando a queda dos níveis de IgG. Demais estudos serão necessários para aprofundar o papel dessa associação.

Figura 36 – Gráfico da região do cromossomo 20 indicando a localização do marcador BICF2P611903, $p = 5,03 \times 10^{-6}$ associado aos níveis de IgG anti-*L. (L.) infantum*. SNP localizado a 49 Kb do gene *IL17RB*

Fonte: (BATISTA, 2015).

Figura 57 – Comparação dos níveis de IgG *L. (L.) infantum*, TNF- α , nitrito e índice de proliferação de PBMC entre os genótipos do SNP (BICF2P611903) variante posicional na vizinhança do gene *IL17RB*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo B com diminuição de IgG *L. (L.) infantum*, TNF- α , nitrito e índice de proliferação de PBMC.

O marcador BICF2G630654815, $p = 9,64 \times 10^{-6}$, localizado na posição 12.120.865 do cromossomo 21. O alelo B apresentou frequência de 7,5% na amostragem testada. Esse SNP localiza-se próximo e em desequilíbrio de ligação com um SNP no gene *NOX4* ($D' = 0,61$). Na mesma região encontra-se o gene *RAB38* ($D' = 0,75$) (**Figura 58**). Aqui, o alelo B do SNP BICF2G630654815 foi associado ao aumento do nível de IgG anti-*L. (L.) infantum* (**Figura 59**) e pode representar o aumento da disseminação do parasito se levarmos em consideração a correlação entre a resposta de IgG com a carga parasitária no linfonodo ($r = 0,507$; $p < 0,001$). O marcador BICF2P918770 localizado na mesma região foi associado ao status de infecção (item 0). Esses resultados reforçam a importância dessa região do cromossomo 21 para a susceptibilidade à infecção pela *L. (L.) infantum* em cães e apontam essa região como candidata a análise de replicação, sequenciamento e estudo funcional.

Figura 58 – Gráfico da região do cromossomo 21 mostrando a localização do marcador BICF2G630654815, $p = 9,64 \times 10^{-6}$ associado aos níveis de IgG anti-*L. (L.) infantum*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado nas proximidades dos genes *NOX4* (ENSCAFG00000004369) e *RAB38* (ENSCAFG00000004387).

Figura 59 – Comparação dos níveis de IgG anti-*L. (L.) infantum* entre os genótipos do SNP BICF2G630654815 variante posicional na vizinhança dos genes *NOX4* e *RAB38*. Associação do alelo B com o aumento dos níveis de IgG anti-*L. (L.) infantum*

Fonte: (BATISTA, 2016).

O terceiro marcador associado aos níveis de IgG anti- *L. (L.) infantum* foi o BICF2G630804562, $p = 3 \times 10^{-6}$, localizado na posição 12.061.517 do cromossomo 26. O alelo A apresentou frequência de 5,6 % na amostragem estudada e está localizado a aproximadamente 617 pb do gene *SH2B3* (**Figura 60**) que codifica a proteína adaptadora Lnk envolvida em uma série de vias de sinalização de citocinese em linfócitos e hematopoiese. Lnk regula negativamente a expansão de células hematopoiéticas da linhagem linfóide e altera a maturação de linfócitos B em camundongos (TAKAKI et al., 2003). Além disso, a Lnk regula negativamente a expressão do receptor IL-12R β 1 em células dendríticas levando à diminuição da produção de IFN- γ em camundongo (MORI et al., 2014). Em nosso conjunto de dados, nós observamos que o alelo A foi associado ao aumento crítico de IgG, IgA, IgE e IgM anti-*L. (L.) infantum*. O alelo A também foi associado ao aumento de IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β e a uma maior proliferação em PBMC nos cães portadores desse alelo (**Figura 61**). Os dados apresentados sugerem que o alelo A pode estar envolvido no bloqueio da função do Lnk, entretanto a magnitude dessas associações deve ser melhor investigada, já que cerca de 30% dos cães homozigotos BB não tiveram resultado negativo na PCR enquanto 100% dos cães heterozigotos AB e homozigotos AA foram positivos na PCR.

Figura 60 – Gráfico da região do cromossomo 26 de localização do marcador BICF2G630804562, $p = 3 \times 10^{-6}$ associado aos níveis de IgG anti-L. (L.) infanthum. SNP localizado no gene *SH2B3*

Figura 61 – Comparação dos níveis de imunoglobulinas, carga parasitária, estresse oxidativo e clínica entre os genótipos do SNP BICF2G630804562 variante posicional no gene *SH2B3*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo A com o aumento dos níveis de imunoglobulinas e citocinas.

6.8.5 Resposta de IgA anti-*L. (L.) infantum*

Os níveis de IgA de cães severamente doentes (grupo V) foram significativamente maiores em comparação aos níveis de IgA nos grupos II e IV ($p \leq 0,01$) e em relação aos grupos I e III ($p \leq 0,001$), (**Figura 62**). Em análise de regressão linear, a IgA foi positivamente associada ao tratamento anti-LVC ($p < 0,01$) e à origem ($p < 0,001$) (**Tabela 8**). Níveis de IgA vem sendo descritos como aumentados em cães infectados em comparação com cães não infectados (REIS et al., 2006; DE FREITAS et al., 2012) ou sugestivamente aumentados à medida em que ocorre o agravamento da LVC (REIS et al., 2006).

Figura 62 – Níveis de IgA em soro de cães de área endêmica segundo a progressão clínica

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: I - cães não infectados, II - cães expostos, III - cães infectados, IV - cães doentes e V - cães severamente doentes. Box plot representa medianas e intervalos interquartis das Unidades de ELISA. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

A troca de classe de IgM para IgA em linfócitos B depende da influência de TGF- β liberada por linfócitos Th2, Treg ou T_{FH} (MURPHY 2012). Nos cães amostrados aqui, houve aumento dos níveis de TGF- β em sobrenadante de PBMC de cães severamente doentes (V) em comparação com cães expostos (II) (**Figura 63**).

Figura 63 – Níveis de TGF- β em sobrenadante de cultura de PBMC segundo a progressão clínica

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: I - cães não infectados, II - cães expostos, III - cães infectados, IV - cães doentes e V - cães severamente doentes. Box plot representa medianas e intervalos interquartis das diferenças entre os grupos Leish e meio. * $p \leq 0,05$ (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

Complexos imunes de IgA com glicosilação aberrante podem ativar o sistema complemento e incitar inflamação aguda (HASHIMOTO et al., 2012). IgA também pode ligar FcR e ativar podócitos, macrófagos e células dendríticas que internalizam e degradam complexos imunes (YAMAJI et al., 2014). Essa imunoglobulina participa da defesa às superfícies mucosas e pode ser secretada em órgãos que geralmente albergam parasitos no curso da LVC como tubo gastrintestinal, pulmões e rins (NIETO et al., 1992; PINTO et al., 2011; SILVA et al., 2013). Em humanos, a deposição de complexos imunes contendo IgA na membrana basal glomerular causa uma nefropatia imunomediada chamada nefropatia de IgA, na qual as infecções têm participação (SALVADORI, 2015). Em cães infectados pela *L. (L.) infantum* nota-se comumente glomerulonefrite com infiltrado linfoplasmocitário e presença de antígenos do parasito nos rins, o que deduz secreção de imunoglobulinas (COSTA et al., 2010). Nesses cães, o aumento dos níveis de IgA no soro foram associados à presença de depósitos de IgA no tecido renal (NIETO et al., 1992). Além disso, a presença de ambas IgA e IgG anti-*L. (L.) infantum* na urina de cães infectados foi descrita como marcador de lesão renal severa (TODOLÍ et al., 2009).

6.8.6 Associação genômica à resposta de IgA anti-*L. (L.) infantum*

Para avaliar a associação genômica aos níveis de IgA *anti-L. (L.) infantum* foram testadas 165 amostras. O fator de inflação foi de aproximadamente 1, mostrando o controle dos efeitos da estrutura da população sobre a associação. Três marcadores foram considerados significativos (**Figura 64**), porém apenas um marcador no cromossomo 24 manteve grau de significância quando o tratamento contra LVC foi incluído no modelo.

Figura 64 – Análise de associação genômica identificou dois marcadores associados aos níveis de IgA anti-*L. (L.) infantum* ($p < 10^{-5}$) nos cromossomos 2 e 24 em cães de área endêmica

Fonte: (BATISTA, 2016).

O marcador BICF2G630495425, $p = 7,53 \times 10^{-6}$ localizado na posição 76.519.452 do cromossomo 2. O alelo A apresentou frequência de aproximadamente 25% na amostra estudada e está localizado no gene *LIN28A* (**Figura 65**) que codifica a proteína Lin28. Essa proteína age como supressora da biogênese de microRNA por ligar-se ao precursor de miRNA let-7, levando à persistência de células embrionárias. A Lin28 é envolvida na diferenciação final de células progenitoras do néfron. A superexpressão da Lin28 induziu tumor de Wilms em rins de camundongo por bloquear a diferenciação final (URBACH et al., 2014).

Nas **Figura 62** e **Figura 63** nós demonstramos aumento de IgA e aumento de TGF- β em cães severamente doentes (V). A TGF- β é envolvida com acúmulo de matriz extracelular mesangial em nefropatias e foi descrito recentemente como indutor da Lin28 em células mesangiais de murino (PARK et al., 2014). Em nosso conjunto de dados o alelo A foi associado ao aumento dos níveis de IgA anti-*L. (L.) infantum* e aumento discreto de creatinina no soro (**Figura 66**), o que sugere associação do alelo A com aumento da expressão da Lin28 e aponta para uma provável inabilidade das células mesangiais em fagocitar complexos imunes de IgA depositados na membrana basal do filtro glomerular.

Figura 65 – Gráfico da região do cromossomo 2 de localização do marcador BICF2G630495425, $p = 7,53 \times 10^{-6}$ associado aos níveis de IgA anti-*L. (L.) infantum*. SNP localizado no gene *LIN28A*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Figura 66 – Comparação dos níveis de IgA anti-*L. (L.) infantum* entre os genótipos do SNP (BICF2G630495425) variante posicional no gene *LIN28A*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo A com o aumento dos níveis de IgA anti-*L. (L.) infantum* e aumento discreto de creatinina no soro.

O segundo marcador associado com a resposta de IgA foi o BICF2G630499066, $p = 2,14 \times 10^{-6}$, localizado na posição 31.871.459 do cromossomo 24. O alelo A teve frequência de aproximadamente 10% na amostra testada e o SNP em questão está posicionado a aproximadamente 127 kb do gene *MAFB* que codifica o fator de transcrição MafB (Figura 67). O MafB reduz a diferenciação de células dendríticas e a autorenovação de macrófagos funcionais maduros (AZIZ et al., 2009; HOWELL et al., 2012). Por outro lado, MafB foi descrita como essencial para a diferenciação de podócitos. Quando a MafB foi superexpressa em podócitos murinos previniu nefropatia diabética (MORIGUCHI et al., 2006; MORITO et al., 2014). Aqui, o alelo A foi associado a níveis aumentados de IgA anti-*L. (L.) infantum* e ao

Figura 68 – Comparação dos níveis de IgA anti-*L. (L.) infantum* e da carga parasitária entre os genótipos do SNP (BICF2G630499066) variante posicional no gene *MAFB*

Fontes: (BATISTA, 2016).

Legenda: Relação do alelo A com o aumento dos níveis de IgA anti-*L. (L.) infantum* e da carga parasitária no linfonodo.

6.8.7 Resposta de IgE anti-*L. (L.) infantum*

Os níveis de IgE foram mais elevados em cães com doença severa (V) em comparação aos cães dos grupos I e IV ($p \leq 0,001$) e do grupo III ($P \leq 0,01$), mas sem diferença em relação aos cães expostos (II) (**Figura 69**). IgE foi associada à idade ($p < 0,01$) e à origem dos cães ($p < 0,001$) (**Tabela 8**).

Figura 69 – Níveis de IgE em soro de cães de área endêmica segundo progressão clínica

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: I - cães não infectados, II - cães expostos, III - cães infectados, IV - cães doentes e V - cães severamente doentes. Box plot representa medianas e intervalos interquartis das Unidades de ELISA. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

Das imunoglobulinas, a IgE é a menos abundante e de menor meia vida no soro. Essa imunoglobulina pode ligar-se a receptores FcR na superfície de fagócitos e tem alta afinidade por mastócitos e basófilos, portanto é capaz de desencadear reação de hipersensibilidade imediata (MURPHY 2012). Altos níveis de IgE em cães são classicamente associada a reações de hipersensibilidade alérgicas ou infecções causadas por helmintos. Na LVC altos níveis de IgE tem sido associados a estágios avançados de infecção (INIESTA; GÁLLEGO; PORTÚS, 2005), assim como foi observados nos cães severamente doentes desse estudo.

A troca de classe de IgM para IgE em murinos depende da influência da IL-4 e IL-5 liberada por linfócitos T e eosinófilos (MURPHY 2012). Os cães que apresentaram níveis detectáveis de IL-4 em cultura de PBMC estimulada (cães expostos, II), (**Figura 53**), também apresentaram elevação sutil de IgE, semelhante ao que foi observado para IgG. Esse dado indica que a IL-4 poder ser importante para a resposta de IgE também em cães.

6.8.8 Associação genômica à resposta de IgE anti-*L. (L.) infantum*

Para avaliar a associação genômica aos níveis de IgE *anti-L. (L.) infantum* foram testadas 165 amostras. O fator de inflação foi de aproximadamente 1, mostrando o controle

dos efeitos da estrutura da população sobre a associação. Porém, nenhum marcador foi considerado significativo. Um resultado semelhante foi observado para os valores de IgE que não sofreram transformação Box-Cox ou testados em diferentes modelos.

A regulação genética da resposta de IgE total em humanos tem sido a polimorfismo no gene do receptor de IgE em basófilos (WEIDINGER et al., 2008), entretanto, um efeito muito maior na resposta de IgE total tem sido atribuído à regulação epigenética, como a baixa metilação em genes de mediadores inflamatórios em eosinófilos descrita por (LIANG et al., 2015). A importância do papel da regulação epigenética na resposta de IgE ou o baixo poder de análise podem explicar a não identificação de variantes genômicos associados à resposta de IgE em nosso conjunto de dados. A regulação genética da resposta de IgE na LVC não tem sido investigada.

6.8.9 Resposta de IgG anti-saliva de flebotomíneo

A maioria dos animais de área endêmica de LV apresentou nível detectável de anticorpo anti-saliva de *Lu. longipalpis* nos soros, independente do grupo clínico. De um total de 189 amostras de soro testadas pela técnica de ELISA para avaliação dos níveis de IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis*, 132 mostraram-se positivos (70%). Considerando os diferentes grupos de progressão clínica, 13/21 cães do grupo I (62%), 10/12 cães do grupo II (83,3%), 52/56 no grupo III (93%), 34/52 do grupo IV (65,3%) e 10/24 do grupo V (42%) foram positivos. Na análise quantitativa, os níveis de IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis* foram maiores nos animais dos grupos II e III, cães expostos e infectados, em relação aos animais do grupo V ($P \leq 0,05$), cães com doença severa (**Figura 70**) e foram associados com a origem ($p < 0,01$) (**Tabela 9**).

Figura 70 – Níveis de IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* em soro de cães de área endêmica segundo progressão clínica

Fonte: (BATISTA, 2015).

Legenda: I - cães não infectados, II - cães expostos, III - cães infectados, IV - cães doentes e V - cães severamente doentes. Box plot representa medianas e intervalos interquartis das Unidades de ELISA. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis).

Tabela 9 – Análise de regressão multivariada de características não genéticas do hospedeiro na imunidade humoral à infecção natural pela *L. (L.) infantum*

Variáveis não genéticas	IgG anti-HGS de <i>Lutzomyia longipalpis</i>
	Valores de p
Idade	0,264116
Sexo	0,351996
Origem	0,002081 **
Coleira repelente	0,502529

Fonte: (BATISTA, 2016).

Corroborando para a caracterização do grupo de animais expostos, os níveis de IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis* foram avaliados e pudemos observar que 83,3% dos animais deste grupo mostraram níveis detectáveis de anticorpo anti-saliva do vetor, portanto estavam sendo expostos a picada de vetor em área endêmica. Importante salientar, que a grande maioria dos animais avaliados neste estudo apresentou nível detectável de anticorpo anti-saliva de *Lu. longipalpis* nos soros, porém a proporção de cães positivos para anticorpo anti-saliva diminuem à medida que a infecção avança e os sinais clínicos aparecem. Os resultados mostram que quase o dobro dos animais infectados sem sintomas apresentou níveis detectáveis de anticorpo anti-saliva do vetor em relação aos animais severamente doentes (grupo V). Esses achados sugerem que a produção de anticorpo anti-saliva de flebotomíneo

confere um certo grau de proteção ao cão e/ou que cães assintomáticos são mais expostos ao flebotomíneo. A identificação de variantes genômicas associados à resposta de IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* podem ajudar a elucidar essas questões.

6.8.10 Associação genômica à resposta de IgG anti-HGS de *Lutzomyia longipalpis*

Para avaliar a associação genômica aos níveis de IgG anti-homogenato de glândula salivar (HGS) de *Lu. longipalpis* foram testadas 178 amostras após todas as filtragens. Para essa análise foram excluídas do modelo as variáveis vacina anti-LVC e tratamento anti-LVC. O valor do fator de inflação foi de aproximadamente um, indicando o controle dos efeitos da estrutura da população sobre a associação. Cinco marcadores foram significativos (**Figura 71**).

Figura 71 – Análise de associação genômica identificou 5 marcadores associados aos níveis de IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* ($p < 10^{-5}$) nos cromossomos 2, 20 e 31 em cães de área endêmica

Fonte: (BATISTA, 2016).

No cromossomo 2, o marcador BICF2P328549, $p = 6,5 \times 10^{-6}$, foi encontrado na posição 52.946.782. O alelo A apresentou frequência de 7,6% na amostra de cães avaliados e está localizado próximo e em desequilíbrio de ligação total ($D' = 1$) com um SNP no gene *ERBB2IP* (**Figura 72**). Esse gene codifica a proteína Erbin envolvida na regulação da via da MAP quinase, na inibição da via NF- κ B e de citocinas dependentes de Nod2, além de estar associado à inibição da via de sinalização de TGF- β (HUANG et al., 2003; MCDONALD, 2005; DAI et al., 2007). Em nossa amostragem, o alelo A foi associado com níveis aumentados de IFN- γ e TGF- β (**Figura 73**). Esses dados apontam para uma possível associação do alelo A com o bloqueio do gene *ERBB2IP*. Mais próximo e em desequilíbrio de ligação total ($D' = 1$) com o SNP BICF2P328549 está o gene *CD180* (**Figura 73**). O produto da sua expressão é uma molécula de superfície que coopera com MD-1 e TLR4 na resposta imune inata ao LPS em linfócitos B,

levando à ativação de NF- κ B. CD180 também induz o aumento brusco dos níveis de IgG e de memória imunológica em murino (MIURA et al., 1998; CHAPLIN; CHAPPELL; CLARK, 2013). Em nossa amostragem, os cães homozigotos para o alelo A apresentaram altos níveis de IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* (**Figura 74**). O alelo A do marcador BICF2P328549 foi associado à indução das respostas pró inflamatórias, no entanto, apenas 26/178 (15%) dos cães amostrados é portador desse alelo (AA/AB), os outros 152/178 (85%) é homozigoto para o alelo B (BB) que foi associado à supressão das respostas de IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* e pró inflamatória. Esses achados são compatíveis com o papel imunomodulatório da saliva de *Lu. longipalpis* que cria um microambiente propício à disseminação silenciosa do parasito (KAMHAWI, 2000; ROHOUSOVA; LIPOLDOVA; VOLF, 2005).

Figura 72— Gráfico da região do cromossomo 2 de localização do marcador BICF2P328549, $p = 6,5 \times 10^{-6}$ associado aos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis*

Fonte: (BATISTA, 2015).

Legenda: SNP localizado próximo dos genes *CD180* (ENSCAFG00000007594) *ERBB2IP* (ENSCAFG00000007537). O gráfico LD mostra o desequilíbrio de ligação ($D' = 1$) com um SNPs nos genes *ERBB2IP* e *CD180*.

Figura 73 – Comparação dos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis*, IFN- γ e TGF- β entre os genótipos do SNP (BICF2P328549) em desequilíbrio de ligação com o gene *ERBB2IP*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo A com o aumento dos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis*, IFN- γ e TGF- β .

O SNP BICF2P1464798, $p = 4,86 \times 10^{-6}$, localizado na posição 4.931.871 do cromossomo 20. O alelo A apresentou uma frequência de 43,2% nos cães amostrados. Esse SNP está posicionado nas proximidades dos genes *RAB7A_CANFA* e *RAB43* e em desequilíbrio de ligação com um SNP do gene *RAB7A_CANFA* ($D' = 0,65$), (**Figura 74**). A Rab7 controla a acidificação e maturação do fagossomo em fagolisossomo. SCIANIMANICO et al., 1999 demonstraram que fagossomo contendo *L. donovani* deficiente em LPG sofreu maturação e adquiriu Rab7 normalmente enquanto que *L. donovani* selvagem inibiu o recrutamento de Rab7. A mesma estratégia foi descrita para *M. tuberculosis* que reduziu o recrutamento de Rab7 mas não de Rab43 (SETO; TSUJIMURA; KOIDE, 2011). Nos cães amostrados, o alelo A do SNP BICF2P1464798 foi associado à diminuição dos níveis de IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* e ao aumento da proporção de cães infectados (**Figura 75**). Esses achados podem estar

relacionados ao processamento e apresentação de antígenos da saliva na montagem de uma resposta humoral específica (CHAPLIN; CHAPPELL; CLARK, 2013). Uma variação no gene da Rab7 em equilíbrio de ligação com o SNP identificado pode indicar um defeito no processamento dos antígenos da saliva de *Lu. longipalpis* que por consequência estaria favorecendo a multiplicação de parasitos.

Figura 74 – Gráfico da região do cromossomo 20 mostrando a localização do marcador BICF2P1464798, $p = 4,86 \times 10^{-6}$ associado aos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado próximo ao gene *RAB7A_CANFA*. O gráfico LD mostra o desequilíbrio de ligação ($D' = 0,65$) com um SNP no gene *RAB7A_CANFA*.

Figura 75 – Comparação dos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis* e da proporção de cães infectados entre os genótipos do SNP BICF2P1464798 em desequilíbrio de ligação com o gene *RAB7A_CANFA*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Associação do alelo A com a diminuição dos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis* e aumento da proporção de cães infectados.

Ainda no cromossomo 20, o SNP BICF2P598981, $p = 2,5 \times 10^{-6}$, localizado na posição 22.812.312 foi significativo. Esse marcador apresentou frequência de 39% nos cães amostrados e está localizado a 941 Kb e em desequilíbrio de ligação ($D' = 0,686$) com o gene *FOXP1* (**Figura 76**). O fator de transcrição codificado por esse gene é um importante regulador transcricional no desenvolvimento de linfócitos B e T quiescentes, regulador negativo da proliferação de células epiteliais e da diferenciação de monócito em macrófago e das funções deste (SHI et al., 2008; FENG et al., 2012; SAGARDOY et al., 2013). O alelo A está presente em 39% dos cães amostrados e foi associado à diminuição dos níveis de IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* e ao aumento de IL-10 (**Figura 77**). Esses achados nos levam a supor que o alelo A do SNP em questão pode estar implicado na ativação da atividade de Foxp1.

Figura 76 – Gráfico da região do cromossomo 20 mostrando a localização do marcador BICF2P598981, $p = 4,86 \times 10^{-6}$ associado aos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNP localizado a 941 Kb do gene *FOXP1*. O gráfico LD mostra o desequilíbrio de ligação ($D' = 0,686$) com um SNP próximo ao *FOXP1*.

Figura 77 – Comparação dos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis* e IL-10 entre os genótipos do SNP (BICF2P598981) variante posicional localizado a 1,57 Mb do gene *FOXP1*

Fonte: (BATISTA, 2015).

Legenda: Associação do alelo A com a diminuição dos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis* e aumento de IL-10.

Dois marcadores foram significativos no cromossomo 31. O SNP BICF2S22913770, $p = 8,39 \times 10^{-6}$, localizado na posição 31.580.371 e o SNP BICF2S23210577, $p = 8,39 \times 10^{-6}$, localizado na posição 31.558.977 provavelmente entre dois blocos de desequilíbrio de ligação. Ambos apresentaram frequência de 37,6% na amostragem testada. Esses marcadores estão a aproximadamente 733 Kb e em baixo desequilíbrio de ligação ($D' = 0,215$) com o gene *RUNX1*

(Figura 77). Esse gene codifica um fator de transcrição chamado CBF que liga o sítio ativo de muitos *enhancers* e promotores de genes como o *enhancer* do receptor de linfócitos T e os promotores do LCK, IL-3 e GM-CSF. O CBF está envolvido no desenvolvimento, diferenciação de linfócitos B e na sinalização do receptor de antígeno de linfócito B (BCR). Por associar-se ao *FOXP3*, CBF controla a ação supressora dos linfócitos T regulatórios (Treg). CBF também está envolvida na geração de linfócitos Th17 regulatórios (WHITEMAN; FARRELL, 2006; LI et al., 2012; SCHMIDL et al., 2014). Nos cães amostrados, o alelo B do SNP BICF2S22913770 e o alelo A do SNP BICF2S23210577 mostraram ações agonistas na diminuição dos níveis de IgG anti-HGS de *Lutzomyia longipalpis*, índice de proliferação de PBMC, IFN- γ , TNF- α , NO, H₂O₂ e aumento da carga parasitária no linfonodo (Figura 78). Na mesma região, encontram-se os genes da superóxido dismutase 1 (*SOD1*), do receptor beta da IL-10 (*Q3HTU8_CANFA*), dos receptores um e dois do interferon alpha (*IFNAR1* e *IFNAR2*) e do receptor dois do interferon gama (*IFNGR2*) (Figura 74).

Figura 78 – Gráfico da região do cromossomo 31 de localização dos marcadores BICF2S22913770 e BICF2S23210577 associados aos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNPs localizados a aproximadamente 733 Kb do gene *RUNX1*. O gráfico LD mostra o desequilíbrio de ligação ($D' = 0,215$) com um SNP próximo ao *RUNX1*.

Figura 79 – Gráfico da região do cromossomo 31 de localização dos marcadores BICF2S22913770 e BICF2S23210577 associados aos níveis de IgG anti-HGS *Lu. longipalpis*

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: SNPs localizados nas proximidades dos genes da superóxido dismutase 1 (*SOD1*), do receptor beta da IL-10 (*Q3HTU8_CANFA*), dos receptores um e dois do interferon gamma alpha (*IFNAR1* e *IFNAR2*) e do receptor dois do interferon gama (*IFNGR2*). O gráfico LD mostra o desequilíbrio de ligação ($D' = 0,305$) dos marcadores identificados por associação significativa com os genes supracitados.

Figura 80 – Comparação dos parâmetros de imunidade, infecção, explosão respiratória e infecção entre os genótipos dos SNPs BICF2S22913770 e BICF2S23210577 localizados a aproximadamente 733 Kb do gene *RUNX1*

(continuação)

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Relação dos alelos B e A, respectivamente, agonistas na diminuição dos níveis de IgG anti-HGS de *Lutzomyia longipalpis*, índice de proliferação de PBMC, IFN- γ , TNF- α , NO, H₂O₂ e aumento da carga parasitária no linfonodo.

Esses achados indicam que os alelos B e A dos respectivos SNPs BICF2S22913770 e BICF2S23210577 podem estar envolvidos na perda da função do fator CBF quanto à indução da diferenciação linfócitos B e sinalização para a produção de imunoglobulinas e a sua ativação quando à indução da resposta T regulatória ou inibição da resposta Th17.

A presença de anticorpos anti-saliva foi positivamente correlacionado com o número de fêmeas de *Lu. longipalpis* em cães e vem sendo propostas como marcadores de exposição à picada de flebotomíneo (HOSTOMSKA et al., 2008; SOARES et al., 2013). Entretanto nossas análises revelaram que dos 132 cães infectados do nosso estudo, 37 (28%) mostraram resultado negativo para IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis*, sendo que 30 destes (81%) foram do grupo sintomático, ou seja, esses cães foram expostos o suficiente para desenvolver doença. A possibilidade de transmissão por outros artrópodes deve ser melhor investigada nesses casos. A idade dos cães residentes em área endêmica poderia indicar o tempo de exposição à picada do vetor, no entanto, as análises de regressão multivariada mostraram que não houve associação significativa entre os níveis de IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* e a idade dos cães nem tão pouco ao uso de coleira repelente que é utilizada como método de prevenção da exposição ao vetor. Juntos, esses dados sugerem a existência de um componente genético na resposta de IgG anti-saliva de flebotomíneo em cães.

No presente estudo, os resultados do GWAS para IgG anti-HGS de *Lutzomyia longipalpis* ganharam um destaque especial por terem identificado cinco variantes genômicas envolvidos de alguma maneira na supressão da resposta pró inflamatória à infecção por *L. (L.) infantum*. As análises indicaram que todos os alelos associados ao aumento do nível de IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* foram igualmente associados ao aumento do nível de citocinas durante o ensaio de linfoproliferação, principalmente às citocinas pró inflamatórias. Esses achados, além de corroborarem com os achados de ROHOUSOVA; LIPOLDOVA; VOLF, 2005 que demonstraram que saliva de *Lu. longipalpis* faz modulação negativa da resposta pró inflamatória; identificou variantes genômicas que provavelmente tornam o cão insensível aos efeitos supressores da saliva da *Lu. longipalpis* por produzirem altos níveis de anticorpos neutralizadores da saliva.

Em corroboração com os achados mencionados acima, o alelo A do SNP BICF2P328549 foi associado ao aumento crítico da IgG anti-HGS de *Lu. longipalpis* e conferiu proteção clínica absoluta aos cães homozigotos para esse alelo. Esse resultado sugere que a resposta humoral específica pode neutralizar os componentes da saliva e inibir seus efeitos supressores que formariam um ambiente propício ao estabelecimento da infecção pela *L. (L.) infantum* (KAMHAWI, 2000).

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da picada do flebotomíneo na pele do hospedeiro mamífero. PRATES et al., 2011 avaliaram o efeito da

saliva do flebotomíneo sobre neutrófilos murinos e humanos e observaram que a saliva induz apoptose dependente de caspases e mediada por FasL, reduziu os níveis de ROS e induziu o aumento da carga parasitária. Curiosamente, o pré-tratamento de neutrófilos com soro imune anti-saliva de *Lu. longipalpis* ou proteinase K aboliu a apoptose, o que indicou a neutralização de proteínas da saliva por anticorpos específicos presentes no soro. Além disso, a saliva potencializou o recrutamento de macrófagos por induzir CCL2/MCP-1 em neutrófilos infectados com *L. (L.) infantum* durante ensaio de quimiotaxia (**Figura 81**). Esses achados sustentam a ideia de que a saliva favorece a infecção de novas células do hospedeiro sem induzir resposta inflamatória, a qual levaria à eliminação do parasito nos momentos iniciais, antes mesmo do estabelecimento da infecção.

Figura 81 – Entrada “silenciosa” da *L. (L.) infantum*.

Fonte: Traduzido de PRATES, 2011.

Legenda: Indução de apoptose, inibição de espécies reativas de oxigênio, aumento da carga de *L. (L.) infantum* em neutrófilos e recrutamento de macrófagos para o "lago sanguíneo" pela saliva de *Lutzomyia longipalpis*. A apoptose de neutrófilos foi abolida pelo pré-tratamento com soro anti-saliva.

Todos esses resultados apontam para a necessidade de inclusão de estratégias que venham a inibir os efeitos supressores da saliva da *Lu. longipalpis* em métodos de imunoprevenção contra a LVC.

A **Tabela 10** demonstra todos os marcadores de SNP identificados como significativamente associados aos fenótipos testados.

Tabela 10 – Localização, frequência (Freq.), efeito (OR) e significância (p) dos SNPs identificados. Modelos de regressão ajustados, fatores de inflação, fenótipos testados e genes potencialmente associados aos fenótipos

Fenótipo (Ft. inflação)	SNP	Cromossomo	Posição	Freq.	OR (p)	Modelo ajustado	Genes
Status de infecção (0,95)	BICF2P991516	21	2.349.517	93,5% PCR+/ 92% PCR-	$1,26 \pm 1,25$ ($4,5 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>PRGR_CANFA</i>
	BICF2P918770	21	11.185.288	95% PCR+/ 90% PCR-	$1,98 \pm 1,88$ ($4,98 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>GRM5, NOX4, RAB38, CTSC</i>
	BICF2P437413	34	34.726.552	96,5% PCR+/ 89,2% PCR-	$3,42 \pm 3,58$ ($5,8 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>PRKCI, SMAD7, IL1RAP, IL12A</i>
Status clínico (1,14)	BICF2P914789	18	36.551.193	61,3% Sinto/ 28,6% Assinto	$3,96 \pm 2,18$ ($6,73 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação + tratamento]	<i>CATA_CANFA</i>
Progressão clínica (1,02)	BICF2G630350444	3	75.811.526	41,60%	($4,64 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>LIAS</i>
	BICF2P989309	12	23.597.411	22,70%	($5,07 \times 10^{-7}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação + tratamento]	<i>IL17A e IL17F</i>
LST (1,04)	BICF2P161375	7	60.437.942	26,4% LST+/ 6,8% LST-	$4,93 \pm 3,77$ ($5,94 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>MEP1B</i>
	BICF2P650503	7	77.204.787	18% LST+/ 2,98% LST-	$7,17 \pm 14,62$ ($2,37 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>PTPRM</i>

(continuação)

LST (1,04)	BICF2P736708	11	55.462.240	25% LST+/ 10% LST-	$3 \pm 1,79$ ($1,14 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>TLN1, TGFB1</i>
	BICF2P506643	23	10.472.374	16,6% LST+/ 4,9% LST-	$3,85 \pm 3,46$ ($1,22 \times 10^{-5}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>ITGA9</i>
Induração (1,08)	BICF2G630490347	10	53.489.836	40,30%	($7,31 \times 10^{-7}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>EPCAM, CALM2</i>
LPA (1,12)	BICF2P1209884	11	43.350.122	1,5% LPA+/ 8,1% LPA-	$0,17 \pm 0,42$ ($3,4 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>KIAA1797/FOCAD</i>
	BICF2P826452	7	47.582.500	71,9% LPA+/ 48,6% LPA-	$0,39 \pm 0,21$ ($2,75 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação + tratamento]	<i>SIAT8E, PIAS2, SMAD2, IL6R</i>
IgM anti-Lsh (0,97)	BICF2P397161	9	48.301.319	5%	($6,13 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação + tratamento]	<i>NXN</i>
	BICF2P1333073	23	30.383.100	5,40%	($3,96 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação + tratamento]	<i>SH3BP5</i>
IgG anti-Lsh (1,08)	BICF2P611903	20	39.083.622	18%	($5,03 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>IL17RB</i>
	BICF2G630654815	21	12.120.865	7,50%	($9,64 \times 10^{-6}$)	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>RAB38, NOX4, CTSC</i>
IgG anti-Lsh (1,08)	BICF2G630804562	26	12.061.517	5,60%	(3×10^{-6})	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>SH2B3</i>

(conclusão)

IgA anti-Lsh (1,04)	BICF2G630495425	2	76.519.452	25%	$(7,53 \times 10^{-6})$	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação]	<i>LIN28A</i>
	BICF2G630499066	24	31.871.459	10%	$(2,14 \times 10^{-6})$	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente + vacinação + tratamento]	<i>MAFB</i>
IgG anti-HGS <i>Lu. Longpalpis</i> (1,07)	BICF2P328549	2	52.946.782	7,60%	$(6,5 \times 10^{-6})$	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente]	<i>CD180, ERBB2IP</i>
	BICF2P1464798	20	4.931.871	43,20%	$(4,86 \times 10^{-6})$	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente]	<i>RAB7A_CANFA</i>
	BICF2P598981	20	22.812.312	39%	$(2,5 \times 10^{-6})$	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente]	<i>FOXP1</i>
	BICF2S22913770	31	31.558.977	37,60%	$(8,39 \times 10^{-6})$	[y ~ média + origem + sexo + idade + coleira repelente]	<i>RUNX1, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR2, Q3HTU8_CANFA</i>
	BICF2S23210577		31.580.371				

Fonte: (BATISTA, 2016).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo explorou a genética da resposta de cães à infecção natural pela *L. (L.) infantum* e apontou mecanismos capazes de influenciar resultados dentro da complexidade que caracteriza a LVC. Uma gama de eventos ocorrem concomitantemente no curso da infecção, porém os momentos iniciais parecem ter um papel decisivo para o destino da infecção. Os resultados reforçam a importância do vetor no estabelecimento da infecção pela *L. (L.) infantum*. A partir dos dados gerados, é possível propor que a capacidade de produção de anticorpos anti-saliva de flebotomíneo possibilita a inibição do efeito supressor da saliva e a montagem de uma resposta inflamatória pela imunidade inata. Alguns marcadores identificados indicaram que a resposta Th17 pode ter o papel de potencializar a inflamação na LVC. O contexto inflamatório poderia eliminar parasitos e favorecer a maturação de fagócitos e a indução da resposta Th1 capaz de intensificar os mecanismos microbicidas levando à eliminação de parasitos que porventura escapem da imunidade inata, embora possa causar doença imunomediada por exacerbação da inflamação quando não é devidamente regulada (**Figura 82**).

Os achados são consistentes com a ideia de que os parasitos que evadem a imunidade inata encontram maior facilidade em estabelecer infecção em cães portadores de variantes de alta frequência e estão envolvidos com ativação de fagócitos, recrutamento de proteases lisossomais para o fagossomo e geração de ânion superóxido pela ativação da NADPH oxidase.

Figura 82 – Representação de resposta inflamatória exacerbada, sucessiva à picada de um flebotomíneo infectado pela *L. (L.) infantum* em pele de cão capaz de produzir anticorpo anti-saliva de flebotomíneo

Fonte: (LEGUTKE, 2016).

Legenda: Nesses cães ocorre neutralização do efeito supressor da saliva e montagem de resposta inflamatória que juntamente com a resposta Th17, favorece a maturação de fagócitos produtores de IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18 indutoras da ativação de linfócito T e sua diferenciação em Th1 (IFN-γ e TNF-α) ou Th17 (IL-17 e IL-22) capazes de exacerbar a inflamação e reduzir a infecção, embora possam causar lesão celular e tecidual por excesso de produção e liberação de moléculas tóxicas derivadas da explosão respiratória. A migração de leucócitos para o sítio de inflamação é favorecida pela expressão de integrina α9 (ITGA9) e PTPμ. A ativação de pró citocinas IL-1β, IL-6 e IL-18 é catalizada pela Meprina-β. A estabilidade na sinapse imunológica favorece a diferenciação de Th1 e é assegurada pela expressão de LFA-1 ancorada no citoesqueleto pela talina.

A resposta clínica de cães com diferentes perfis de imunidade mostrou que a manifestação de sintomas imunomediados parece ser mais frequente na LVC do que se tem conhecimento, o que reforça a importância da ação de enzimas antioxidativas capazes de mitigar os malefícios do estresse oxidativo. Nesse campo, a genética parece ter importância quanto à capacidade de gerar catalase e ácido lipóico (**Figura 83**).

Figura 84 – Estabelecimento da infecção em um contexto anti-inflamatório propiciado pela ação supressora da saliva de flebotômíneo

Fonte: (LEGUTKE, 2016).

Legenda: A diferenciação de linfócitos Treg é favorecida por maturação de fagócitos insuficiente. O excesso de resposta T regulatória é permissiva à disseminação de *L. (L.) infantum* mais resistentes aos mecanismos microbicidas.

No que diz respeito à genética da imunidade humoral, variantes em genes envolvidos na diferenciação de linfócitos B e eliminação de complexos imunes parecem afetar criticamente os níveis das imunoglobulinas, incluindo genes implicados na predisposição à nefropatias. Esses marcadores destacaram-se como candidatos para estudos de imunomodulação e terapia da glomerulonefrite associada a LVC.

Os genes associados ao LST foram relacionados à adesão, proliferação celular e indução da resposta pró inflamatória, o que evidenciou a complexidade da resposta de hipersensibilidade tardia ao antígeno e apontou possíveis causas para a baixa frequência do resultado LST+ na população canina. Já os marcadores identificados na vizinhança de genes supressores de tumores, portanto reguladores de proliferação celular, indicaram contribuições complementares para a não responsividade de parte dos cães ao LST e ao LPA.

Por fim, os resultados desse estudo apontam regiões cromossômicas úteis para a elucidação da resposta à infecção por *L. (L.) infantum* em cães e alvos potenciais para estudos funcionais, estratégias profiláticas e terapêuticas específicas para a espécie canina.

8 CONCLUSÕES

Os achados das avaliações clínica, imunológica e análise de associação genômica desse estudo permitem as seguintes conclusões:

- I. A infecção de cães pela *L. (L.) infantum* foi associado a SNPs em desequilíbrio de ligação com alelos não protetores nos genes *PRGR_CANFA*, *RAB38*, *NOX4*, *CTSC*, *PRKCI* e na vizinhança dos genes *SMAD7*, *IL1RA*, *IL12A_CANFA* relacionados a ativação de fagócitos, mecanismos microbicidas, sobrevivência intracelular de *Leishmania* e com resposta pró inflamatória;
- II. A resposta clínica de cães à infecção natural pela *L. (L.) infantum* foi associado com um SNP em desequilíbrio de ligação com um alelo não protetor no gene *CATA_CANFA*; a um alelo protetor no gene *LIAS* e a um SNP em desequilíbrio de ligação com um alelo protetor próximo dos genes *IL17A* e *IL17F*. Esses genes estão relacionados à proteção contra danos do estresse oxidativo e com a indução da resposta pró inflamatória.
- III. O resultado positivo no teste intradérmico de hipersensibilidade tardia à leishmanina foi associada à resposta imune Th1 que promoveu controle do parasitismo, porém predispôs os cães à doença imunomediada, enquanto o resultado negativo foi associado à resposta T regulatória e ao aumento do parasitismo;
- IV. A resposta intradérmica de hipersensibilidade tardia à leishmanina foi associada a regiões cromossômicas contendo os genes *MEP1B*, *PTPRM*, *TLN1*, *TGFBR1*, *ITGA9*, *EPCAM* e *CALM1* relacionados a maturação de fagócitos, migração de leucócitos pela matriz extracelular, adesão célula a célula durante a migração celular e durante a sinapse imunológica, diferenciação de linfócitos T, migração e proliferação celular. Dois marcadores foram identificados em regiões anteriormente descritas como importantes para a resposta ao teste da leishmanina.

- V. A resposta proliferativa de linfócitos foi dependente da intensidade de parasitismo e associada regiões contendo os genes *FOCAD*, *PIAS2*, *SMAD2* e *IL6R* envolvidos com supressão tumoral e diferenciação de linfócitos Th17 ou Treg;
- VI. Os níveis de IgA, IgE e IgG aumentaram à medida em que a leishmaniose visceral canina se tornou mais grave;
- VII. A resposta de IgM anti-*L. (L.) infantum* foi associado a regiões contendo os genes *NXN* e *SH3BP5* relacionados com inibição do crescimento, diferenciação e ativação de linfócitos B e vias de sinalização de TLR4 e TLR9;
- VIII. A resposta de IgG anti-*L. (L.) infantum* foi associada a regiões contendo os genes *IL17RB*, *NOX4*, *RAB38*, *CTSC*, *SH2B3* envolvidos com indução de resposta pró inflamatória, mecanismos microbicidas, sobrevivência intracelular de *Leishmania*, linfopoiese e citocinese. A região de um alelo de susceptibilidade à infecção foi replicada para IgG.
- IX. A resposta de IgA anti-*L. (L.) infantum* foi associada a regiões contendo os genes *LIN28A* e *MAFB* envolvidas com predisposição à nefropatia glomerular;
- X. Os níveis de IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis* foram aumentados em cães expostos não infectados, cães infectados assintomáticos e foram associados a regiões contendo os genes *ERBB2IP*, *CD180*, *RAB7A_CANFA*, *FOXP1*, *RUNX1*, *SOD1*, *Q3HTU8_CANFA*, *IFNAR1*, *IFNAR2* e *IFNGR2* envolvidos com supressão da resposta inflamatória, produção de imunoglobulina via TLR4 e sobrevivência intracelular de *Leishmania*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKILESH, S.; HUBER, T. B.; WU, H.; WANG, G.; HARTLEBEN, B.; KOPP, J. B.; MINER, J. H.; ROOPENIAN, D. C.; UNANUE, E. R.; SHAW, a. S. Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 3, p. 967–972, 2008.
- ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEG0, L.; RENIER, C.; SANCHÉZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2763–2771, 2002.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, n. Feb., p. 1–88, 2004.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Den. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVES, C. F.; DE AMORIM, I. F. G.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–358, 2009.
- AZIZ, A.; SOUCIE, E.; SARRAZIN, S.; SIEWEKE, M. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. **Science**, v. 326, n. Nov, p. 867–871, 2009.
- BACANU, S.-A.; DEVLIN, B.; ROEDER, K. Association studies for quantitative traits in structured populations. **Genetic Epidemiology**, v. 22, n. 1, p. 78–93, 2002.
- BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETTO, M.; COSTA, C. H.; COFFMAN, R. L.; JOHNSON, W. D.; CARVALHO, E. M. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 6, p. 1515–1518, 1996.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEG0, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–30, 2008.
- BAÑULS, A.-L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite: genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**, p. 1–458, 2007.
- BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329–337, 2006.

BARBOSA, M. a G.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SOARES-CLEMENTE, M.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O. R.; DE BRITO, T. V.; DA FONSECA, I. P.; ALVES, L. C.; SANTOS-GOMES, G. M. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, n. 4, p. 336–344, 2011.

BATISTA, L. F. S.; SEGATTO, M.; GUEDES, C. E. S.; SOUSA, R. S.; RODRIGUES, C. A. T.; BRAZUNA, C. M.; SILVA, J. S.; SANTOS, S. O.; LARANGEIRA, D.; MACEDO, M. An Assessment of the Genetic Diversity of *Leishmania infantum* Isolates from Infected Dogs in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 799–806, 2012.

BELO, V. S.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S.; SIMÕES, T. C.; NASCIMENTO, B. W. L.; DA SILVA, E. S.; STRUCHINER, C. J. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. e2182, 2013.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006.

BIANCHI, C.; SELLKE, F. W.; DEL VECCHIO, R. L.; TONKS, N. K.; NEEL, B. G. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase mu is expressed in specific vascular endothelial beds in vivo. **Experimental Cell Research**, v. 248, n. 1, p. 329–38, 1999.

BLACKWELL, J. M. Genetics and genomics in infectious disease susceptibility. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 11, p. 521–526, 2001.

BLACKWELL, J. M.; FAKIOLA, M.; IBRAHIM, M. E.; JAMIESON, S. E.; JERONIMO, S. B.; MILLER, E. N.; MISHRA, A.; MOHAMED, H. S.; PEACOCK, C. S.; RAJU, M.; SUNDAR, S.; WILSON, M. E. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 5, p. 254–66, 2009.

BLACKWELL, J. M.; GOSWAMI, T.; EVANS, C. A. W.; SIBTHORPE, D.; WHITE, J. K.; SEARLE, S.; MILLER, E. N.; PEACOCK, C. S.; IBRAHIM, M. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. **Cell**, v. 3, n. 12, p. 773–784, 2011.

BLACKWELL, J. M.; JAMIESON, S. E.; BURGNER, D. HLA and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 370–385, 2009.

BLACKWELL, J. M.; SEARLE, S.; MOHAMED, H.; WHITE, J. K. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: Continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 197–203, 2003.

BOGGIATTO, P. M.; RAMER-TAIT, A. E.; METZ, K.; KRAMER, E. E.; GIBSON-CORLEY, K.; MULLIN, K.; HOSTETTER, J. M.; GALLUP, J. M.; JONES, D. E.; PETERSEN, C. a. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 267–273, 2010.

BOYKO, A. R. The domestic dog: man's best friend in the genomic era. **Genome Biology**, v. 12, n. 2, p. 216, 2011.

BRACHELENTE, C.; MÜLLER, N.; DOHERR, M. G.; SATTler, U.; WELLE, M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 166–175, 2005.

BRADLEY, D. J. Regulation of Leishmania populations within the host. II. genetic control of acute susceptibility of mice to Leishmania donovani infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 30, n. 1, p. 130–140, 1977.

BRADLEY, D. J.; KIRKLEY, J. Regulation of Leishmania populations within the host. I. the variable course of Leishmania donovani infections in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 30, n. 1, p. 119–129, 1977.

BRADLEY, D. J.; TAYLOR, B. a; BLACKWELL, J.; EVANS, E. P.; FREEMAN, J. Regulation of Leishmania populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 37, n. 1, p. 7–14, 1979.

BRANDONISIO, O.; PANUNZIO, M.; FALIERO, S. M.; CECI, L.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in Leishmania infantum-infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 53, n. 1-2, p. 95–103, 1996.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde, 2006.

BUCHETON, B.; ABEL, L.; KHEIR, M. M.; MIRGANI, A.; EL-SAFI, S. H.; CHEVILLARD, C.; DESSEIN, A. Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. **Genes and Immunity**, v. 4, n. 2, p. 104–109, 2003.

BUCHETON, B.; KHEIR, M. M.; EL-SAFI, S. H.; HAMMAD, A.; MERGANI, A.; MARY, C.; ABEL, L.; DESSEIN, A. The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 14, p. 1449–1457, 2002.

BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; LORD, J. M.; AKBAR, A. N.; SCHEEL-TOELLNER, D.; SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 199–204, 2001.

BUENO, R.; CARVALHO NETA, A. V; XAVIER, M. N.; OLIVEIRA, R. G.; DINIZ, S. a; MELO, M. N.; SANTOS, R. L. cDNA sequencing and expression of Nramp1 (Slc11a1) in dogs phenotypically resistant or susceptible to visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 3-4, p. 332–9, 2009.

CABELLO, P. H.; MARIA, A.; LIMA, V. M. D.; S, E. Familial aggregation of *Leishmania chagasi* infection in northeastern Brazil. **American Journal of Human Genetics**, v. 52, n. 4, p. 364–365, 1995.

CARDOSO, L.; NETO, F.; SOUSA, J. C.; RODRIGUES, M.; CABRAL, M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 3, p. 213–20, 1998.

CARSON, C.; QUINNELL, R. J.; DAY, M. J.; COURTENAY, O. Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of canine IgG1 and IgG2, and associations with infection outcome in *Leishmania infantum* naturally infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 133, n. 2-4, p. 264–8, 2010.

CASTRO, I. P. De; VINICIUS, M.; SOUSA, C. De. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 799–804, 2012.

CHAPLIN, J. W.; CHAPPELL, C. P.; CLARK, E. a. Targeting antigens to CD180 rapidly induces antigen-specific IgG, affinity maturation, and immunological memory. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 10, p. 2135–2146, 2013.

COLOMBANI, P. M.; ROBB, A.; HESS, a D. Cyclosporin A binding to calmodulin: a possible site of action on T lymphocytes. **Science**, v. 228, n. 4697, p. 337–339, 1985.

COLPITTS, S. L.; PUDDINGTON, L.; LEFRANÇOIS, L. IL-15 receptor α signaling constrains the development of IL-17–producing $\gamma\delta$ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 31, p. 9692 – 9697, 2015.

CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, n. 2, p. 667–673, 1995.

CORTESE, L.; ANNUNZIATELLA, M.; PALATUCCI, A. T.; RUBINO, V.; PIANTEDOSI, D.; DI LORIA, A.; RUGGIERO, G.; CIARAMELLA, P.; TERRAZZANO, G. Regulatory T cells, cytotoxic T lymphocytes and a TH1 cytokine profile in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 3, p. 942–949, 2013.

CORTESE, L.; SICA, M.; PIANTEDOSI, D.; RUGGIERO, G.; PERO, M. E.; TERRAZZANO, G.; MASTELLONE, V.; CIARAMELLA, P. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 164, n. 25, p. 778–82, 2009.

COSTA, F. a L.; PRIANTI, M. G.; SILVA, T. C.; SILVA, S. M. M. S.; GUERRA, J. L.; GOTO, H. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 112, 2010.

COURA-VITAL, W. **Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por leishmania (leishmania) infantum e identificação de biomarcadores de infecção**. 2011. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

CRISMAN, J. M.; ZHANG, B.; NORMAN, L. P.; BOND, J. S. Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 7, p. 4510–4519, 2004.

DA COSTA, A. P.; COSTA, F. B.; SOARES, H. S.; RAMIREZ, D. G.; DE CARVALHO ARAÚJO, A.; DA SILVA FERREIRA, J. I. G.; TONHOSOLO, R.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. Environmental factors and ecosystems associated with canine visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 12, p. 765–774, 2015.

DAI, F.; CHANG, C.; LIN, X.; DAI, P.; MEI, L.; FENG, X.-H. Erbin inhibits transforming growth factor signaling through a novel Smad-interacting domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 17, p. 6183–6194, 2007.

DATTA, G.; BERA, T. Evidence for the extracellular reduction of alpha-lipoic acid by *Leishmania donovani* promastigotes: A transplasma membrane redox system. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1512, n. 2, p. 149–157, 2001.

DAWN TEARE, M.; BARRETT, J. H. Genetic linkage studies. **Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 1036–44, 2005.

DE ALMEIDA LEAL, G. G.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; FRANCISCO, A. F.; CARDOSO, J. M.; MATHIAS, F. A. S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3-4, p. 472–82, 2014.

DE FREITAS, J. C. C.; LOPES-NETO, B. E.; DE ABREU, C. R. A.; COURA-VITAL, W.; BRAGA, S. L.; REIS, A. B.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 705–709, 2012.

DE LUNA, R.; VUOTTO, M. L.; IELPO, M. T. L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, a.; GRADONI, L.; MANCINO, D. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 70, n. 1-2, p. 95–103, 1999.

DENG, X.; SABINO, E. C.; CUNHA-NETO, E.; RIBEIRO, a L.; IANNI, B.; MADY, C.; BUSCH, M. P.; SEIELSTAD, M.; INTERNATIONAL, R. C. S. G. F. the N. R. E. D. S.-I. C. Genome wide association study (GWAS) of Chagas cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* seropositive subjects. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79629, 2013.

DERMINE, J. F.; SCIANIMANICO, S.; PRIVÉ, C.; DESCOTEAUX, A.; DESJARDINS, M. Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. **Cellular Microbiology**, v. 2, p. 115–126, 2000.

DOS-SANTOS, W. L. C.; JESUS, E. E.; PARANHOS-SILVA, M.; PEREIRA, a. M.; SANTOS, J. C.; BALEEIRO, C. O.; NASCIMENTO, E. G.; MOREIRA, E. D.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 251–9, 2008.

DUSTIN, M. L. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. **Immunological Reviews**, v. 221, p. 77–89, 2008.

ESCH, K. J.; JUELGAARD, R.; MARTINEZ, P. a; JONES, D. E.; PETERSEN, C. a. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 11, p. 5542–50, 2013.

ETTINGER, N. A.; WILSON, M. E. Macrophage and T-cell gene expression in a model of early infection with the protozoan *Leishmania chagasi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 6, p. e252, 2008.

FAKIOLA, M.; STRANGE, A.; CORDELL, H. J.; MILLER, E. N.; PIRINEN, M.; SU, Z.; MISHRA, A.; MEHROTRA, S.; MONTEIRO, G. R.; BAND, G.; BELLENGUEZ, C.; DRONOV, S.; EDKINS, S.; FREEMAN, C.; GIANNOULATOU, E.; GRAY, E.; HUNT, S. E.; LACERDA, H. G.; LANGFORD, C.; PEARSON, R.; PONTES, N. N.; RAI, M.; SINGH, S. P.; SMITH, L.; SOUSA, O.; VUKCEVIC, D.; BRAMON, E.; BROWN, M. a; CASAS, J. P.; CORVIN, A.; DUNCANSON, A.; JANKOWSKI, J.; MARKUS, H. S.; MATHEW, C. G.; PALMER, C. N. a; PLOMIN, R.; RAUTANEN, A.; SAWCER, S. J.; TREMBATH, R. C.; VISWANATHAN, A. C.; WOOD, N. W.; WILSON, M. E.; DELOUKAS, P.; PELTONEN, L.; CHRISTIANSEN, F.; WITT, C.; JERONIMO, S. M. B.; SUNDAR, S.; SPENCER, C. C. a; BLACKWELL, J. M.; DONNELLY, P. Common variants in the HLA-DRB1–HLA-DQA1 HLA class II region are associated with susceptibility to visceral leishmaniasis. **Nature Genetics**, v. 45, n. 2, p. 208–213, 2013.

FEITOSA, M. F.; AZEVÊDO, E.; LIMA, Â. M.; KRIEGER, H. Genetic causes involved in *Leishmania Chagasi* infection in northeastern - Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 1, 1999.

FENG, X.; IPPOLITO, G. C.; TIAN, L.; WIEHAGEN, K.; OH, S.; WILLEN, J.; BUNTE, R. M.; MAIKA, S. D.; HARRISS, J. V.; CATON, A. J.; BHANDoola, A.; TUCKER, P. W.; HU, H.; SAMBANDAM, A. Foxp1 is an essential transcriptional regulator for the generation of quiescent naive T cells during thymocyte development Foxp1 is an essential transcriptional regulator for the generation of quiescent naive T cells during thymocyte development. **Blood**, v. 115, n. 3, p. 510–518, 2012.

FERNÁNDEZ-BELLON, H.; SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ, A.; RUTTEN, V. P. M. G.; HOEK, A.; RAMIS, A.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, n. 1-2, p. 163–169, 2005.

FERREIRA, G. E. M.; DOS SANTOS, B. N.; DORVAL, M. E. C.; RAMOS, T. P. B.; PORROZZI, R.; PEIXOTO, A. A.; CUPOLILLO, E. The genetic structure of leishmania infantum populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2012.

FIGUEIREDO, M. M.; DEOTI, B.; AMORIM, I. F.; PINTO, A. J. W.; MORAES, A.; CARVALHO, C. S.; DA SILVA, S. M.; DE ASSIS, A. C. B.; DE FARIA, A. M. C.; TAFURI, W. L. Expression of regulatory T cells in jejunum, colon, and cervical and mesenteric lymph nodes of dogs naturally infected with Leishmania infantum. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3704–12, 2014.

FIGUEIREDO, M. M.; MOURA, E. P.; COSTA, M. M.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 7, p. 877–87, 2010.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 397–403, 2001.

GRADE, A. F.; OLIVEIRA, L. C. De; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N.; AQUINO, D.; VAN WEYENBERGH, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; KALIL, J.; GOLDBERG, A. C. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infection, Genetics and Evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 912–6, 2011.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, a.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, a.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214–221, 2006.

FRODSHAM, A. J. Genetics of infectious diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. suppl_2, p. R187–R194, 2004.

FUNATO, Y.; MIKI, H. Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 8, p. 1035–1057, 2007.

GARDINASSI, L.; DOTZ, V.; HIPGRAVE EDERVEEN, A.; DE ALMEIDA, R.; NERY COSTA, C.; COSTA, D.; DE JESUS, A.; MAYBORODA, O.; GARCIA, G.; WUHRER, M.; DE MIRANDA SANTOS, I. Clinical severity of visceral leishmaniasis is associated with changes in immunoglobulin g fc N-glycosylation. **MBio**, v. 5, n. 6, p. 1–12, 2014.

GINEL, P. J.; CAMACHO, S.; LUCENA, R. Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 3, p. 510–4, 2008.

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

GOC, Z.; GREŃ, A.; KAPUSTA, E.; DZIUBEK, K.; SZAROMA, W. Antioxidative effects of α -lipoic acid in the brain, liver and kidneys in selected mouse organs exposed to zymosan. **Acta Biologica Hungarica**, v. 66, n. 3, p. 258–269, 2015.

GRAHAM, A.; HAYWARD, A.; WATT, K.; PILKINGTON, J.; PEMBERTON, J.; DH, N. Fitness correlates of heritable variation in antibody responsiveness in a wild mammal. **Science**, v. 29, n. Oct., p. 662–665, 2010.

GROEN, A.; OVERVOORDE, J.; VAN DER WIJK, T.; DEN HERTOOG, J. Redox regulation of dimerization of the receptor protein-tyrosine phosphatases RPTPa, LAR, RPTPm and CD45. **FEBS Journal**, v. 275, n. 10, p. 2597–2604, 2008.

GUPTA, S. K.; VLAHAKIS, N. E. Integrin $\alpha 9$ mediates enhanced cell migration through nitric oxide synthase activity regulated by Src tyrosine kinase. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 12, p. 2043–2054, 2009.

HAN, D.; TRITSCHLER, H. J.; PACKER, L. α -Lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T-lymphocyte jurkat cell line. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 207, n. 1, p. 258–264, 1995.

HASHIMOTO, A.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, H.; OHSAWA, I.; BROWN, R.; HALL, S.; TANAKA, Y.; NOVAK, J.; OHI, H.; TOMINO, Y. Determination of severity of murine IgA nephropathy by glomerular complement activation by aberrantly glycosylated IgA and immune complexes. **The American journal of Pathology**, v. 181, n. 4, p. 1338–47, 2012.

HAYASHI, T.; FUNATO, Y.; TERABAYASHI, T.; MORINAKA, A.; SAKAMOTO, R.; ICHISE, H.; FUKUDA, H.; YOSHIDA, N.; MIKI, H. Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18586–18593, 2010.

HEDRICK, P. W. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. **Genetics**, v. 117, p. 331–341, 1987.

HEIDARPOUR, M.; SOLTANI, S.; MOHRI, M.; KHOSHNEGAH, J. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1491–1496, 2012.

HELGASON, A.; YNGVADÓTTIR, B.; HRAFNKELSSON, B.; GULCHER, J.; STEFÁNSSON, K. An Icelandic example of the impact of population structure on association studies. **Nature Genetics**, v. 37, n. 1, p. 90–95, 2005.

HELLBERG, C. B.; BURDEN-GULLEY, S. M.; PIETZ, G. E.; BRADY-KALNAY, S. M. Expression of the receptor protein-tyrosine phosphatase, PTPmu, restores E-cadherin-dependent adhesion in human prostate carcinoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 13, p. 11165–73, 2002.

- HOGG, N.; HENDERSON, R.; LEITINGER, B.; MCDOWALL, A.; PORTER, J.; STANLEY, P. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. **Immunological Reviews**, v. 186, n. 4, p. 164–71, 2002.
- HOSEIN, S.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; BLAKE, D. P.; ALLENSPACH, K.; ALBEROLA, J.; SOLANO-GALLEGO, L. Transcription of Toll-Like Receptors 2, 3, 4 and 9, FoxP3 and Th17 Cytokines in a Susceptible Experimental Model of Canine Leishmania infantum Infection. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. e0140325, 2015.
- HOSTOMSKA, J.; ROHOUSOVA, I.; VOLFOVA, V.; STANNECK, D.; MENCKE, N.; VOLF, P. Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly Lutzomyia longipalpis. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 8, n. 4, p. 443–450, 2008.
- HOWELL, K.; POSLUSZNY, J.; HE, L. K.; SZILAGYI, a.; HALERZ, J.; GAMELLI, R. L.; SHANKAR, R.; MUTHU, K. High MafB expression following burn augments monocyte commitment and inhibits DC differentiation in hemopoietic progenitors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 91, n. January, p. 69–81, 2012.
- HUANG, J.; GAO, X.; LI, S.; CAO, Z. Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 24, p. 12829–32, 1997.
- HUANG, Y. Z.; ZANG, M.; XIONG, W. C.; LUO, Z.; MEI, L. Erbin suppresses the MAP kinase pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 2, p. 1108–14, 2003.
- HYDUK, S. J.; RULLO, J.; CANO, a. P.; XIAO, H.; CHEN, M.; MOSER, M.; CYBULSKY, M. I. Talin-1 and kindlin-3 regulate 4 1 integrin-mediated adhesion stabilization, but not G protein-coupled receptor-induced affinity upregulation. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 8, p. 4360–4368, 2011.
- INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1-2, p. 77–81, 2005.
- INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-l-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 6, p. 777–784, 2001.
- ITO, K.; MORIMOTO, J.; KIHARA, a.; MATSUI, Y.; KUROTAKE, D.; KANAYAMA, M.; SIMMONS, S.; ISHII, M.; SHEPPARD, D.; TAKAOKA, a.; UEDE, T. Integrin 9 on lymphatic endothelial cells regulates lymphocyte egress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 8, p. 3080–3085, 2014.
- JAMIESON, S. E.; MILLER, E. N.; PEACOCK, C. S.; FAKIOLA, M.; WILSON, M. E.; BALES-HOLST, a; SHAW, M.; SILVEIRA, F.; SHAW, J. J.; JERONIMO, S. M.; BLACKWELL, J. M. Genome-wide scan for visceral leishmaniasis susceptibility genes in Brazil. **Genes and Immunity**, v. 8, n. 1, p. 84–90, 2007.

JENKINS, M. K.; MILLER, R. A. Memory and anergy: challenges to traditional models of T lymphocyte. **The FASEB Journal**, v. 6, n. April, p. 2428 – 2433, 1992.

JERONIMO, S. M. B.; DUGGAL, P.; ETTINGER, N. A.; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; CABRAL, A. P.; PONTES, N. N.; LACERDA, H. G.; QUEIROZ, P. V.; GOMES, C. E. M.; PEARSON, R. D.; BLACKWELL, J. M.; BEATY, T. H.; WILSON, M. E. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genome wide scan. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 8, p. 1261–1269, 2007a.

JERONIMO, S. M. B.; HOLST, a K. B.; JAMIESON, S. E.; FRANCIS, R.; MARTINS, D. R. a; BEZERRA, F. L.; ETTINGER, N. a; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; LACERDA, H. G.; MILLER, E. N.; CORDELL, H. J.; DUGGAL, P.; BEATY, T. H.; BLACKWELL, J. M.; WILSON, M. E. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with *Leishmania chagasi* infection. **Genes and Immunity**, v. 8, n. 7, p. 539–551, 2007b.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1765–1773, 2000.

KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. Davis: Academic Press, 2008.

KANG, H. M.; SUL, J. H.; SERVICE, S. K.; ZAITLEN, N. a; KONG, S.; FREIMER, N. B.; SABATTI, C.; ESKIN, E. Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. **Nature Genetics**, v. 42, n. 4, p. 348–354, 2010.

KARPLUS, T. M.; JERONIMO, S. M.; CHANG, H.; HELMS, B. K.; BURNS, T. L.; MURRAY, J. C.; MITCHELL, a a; PUGH, E. W.; BRAZ, R. F.; BEZERRA, F. L.; WILSON, M. E. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6919–6925, 2002.

KENNEDY, L. J.; BARNES, a; HAPP, G. M.; QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; CARTER, S. D.; OLLIER, W. E. R.; THOMSON, W. Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 1, p. 43–52, 2002.

KENNEDY, L. J.; BARNES, a; SHORT, a; BROWN, J. J.; SEDDON, J.; FLEEMAN, L.; BRKLJACIC, M.; HAPP, G. M.; CATCHPOLE, B.; OLLIER, W. E. R. Canine DLA diversity: 3. Disease studies. **Tissue Antigens**, v. 69 Suppl 1, n. 6, p. 292–6, 2007.

KOOP, E. a; GEBBINK, M. F. B. G.; SWEENEY, T. E.; MATHY, M.-J.; HEIJNEN, H. F. G.; SPAAN, J. a E.; VOEST, E. E.; VANBAVEL, E.; PETERS, S. L. M. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from receptor protein tyrosine phosphatase-mu-deficient mice. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 3, p. H1218–23, 2005.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527–538, 2014.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E. M.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. a.; SCHÖNIAN, G. Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1–16, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran. Bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

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

LARANJEIRA, D. F.; MATTA, V. L. R. Da; TOMOKANE, T. Y.; MARCONDES, M.; CORBET, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 4, p. 563–571, 2014.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; DA MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 296–300, 2013.

LEE, K.-G.; XU, S.; WONG, E.-T.; TERGAONKAR, V.; LAM, K.-P. Bruton's tyrosine kinase separately regulates NFkappaB p65RelA activation and cytokine interleukin (IL)-10/IL-12 production in TLR9-stimulated B Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 17, p. 11189–98, 2008.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 19–27, 2002.

LI, L.; PATSOUKIS, N.; PETKOVA, V.; BOUSSIOTIS, V. a. Runx1 and Runx3 are involved in the generation and function of highly suppressive IL-17-producing T regulatory cells. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e45115, 2012.

LI, Y. J.; FAN, Y. H.; TANG, J.; LI, J. B.; YU, C. H. Meprin-β regulates production of pro-inflammatory factors via a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) dependent pathway in macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 77–84, 2014.

LIANG, L.; WILLIS-OWEN, S. a. G.; LAPRISE, C.; WONG, K. C. C.; DAVIES, G. a.; HUDSON, T. J.; BINIA, A.; HOPKIN, J. M.; YANG, I. V.; GRUNDBERG, E.; BUSCHE, S.; HUDSON, M.; RÖNNBLÖM, L.; PASTINEN, T. M.; SCHWARTZ, D. a.; LATHROP, G. M.; MOFFATT, M. F.; COOKSON, W. O. C. M. An epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E concentration. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 670–674, 2015.

LIM, L.-M.; CHANG, J.-M.; WANG, I.-F.; CHANG, W.-C.; HWANG, D.-Y.; CHEN, H.-C. Atypical X-linked agammaglobulinaemia caused by a novel BTK mutation in a selective immunoglobulin M deficiency patient. **BMC Pediatrics**, v. 13, p. 150, 2013.

LITTMAN, D. R.; RUDENSKY, A. Y. Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 845–858, 2010.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M. G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRÌ, A.; SOLANO-GALLEGÓ, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10–17, 2012.

LU, J.; REESE, J.; ZHOU, Y.; HIRSCH, E. Progesterone-induced activation of membrane-bound progesterone receptors in murine macrophage cells. **Journal of Endocrinology**, v. 224, n. 8, p. 183–194, 2015.

MANNA, L.; GRAVINO, E.; PICILLO, E.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, v. 360, p. 358–360, 2008.

MANZILLO, V.; OLIVA, G.; PAGANO, A.; MANNA, L.; MAROLI, M.; GRADONI, L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1-2, p. 142–5, 2006.

MARSLAND, B. J.; SOOS, T. J.; SPÄTH, G.; LITTMAN, D. R.; KOPF, M. Protein kinase C θ is critical for the development of in vivo T Helper (Th) 2 cell but not Th1 cell responses. **Cell**, v. 200, n. 2, 2004.

MATSUSHITA, M.; YAMADORI, T.; KATO, S.; TAKEMOTO, Y.; INAZAWA, J.; BABA, Y.; HASHIMOTO, S.; SEKINE, S.; ARAI, S.; KUNIKATA, T.; KURIMOTO, M.; KISHIMOTO, T.; TSUKADA, S. Identification and characterization of a novel SH3-domain binding protein, Sab, which preferentially associates with Bruton's tyrosine kinase (Btk). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 245, n. 2, p. 337–43, 1998.

MAYR, J. a.; FEICHTINGER, R. G.; TORT, F.; RIBES, A.; SPERL, W. Lipoic acid biosynthesis defects. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 37, n. 4, p. 553–563, 2014.

MCDONALD, C. A Role for Erbin in the Regulation of Nod2-dependent NF- κ B signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 40301–40309, 2005.

MCGEACHY, M. J.; BAK-JENSEN, K. S.; CHEN, Y.; TATO, C. M.; BLUMENSCHNIG, W.; MCCLANAHAN, T.; CUA, D. J. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390–1397, 2007.

MENEZES-SOUZA, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GUERRA-SÁ, R.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; OLIVEIRA, G. C.; REIS, A. B. Cytokine and transcription

factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 39–49, 2011.

MIRET, J.; NASCIMENTO, E.; SAMPAIO, W.; FRANÇA, J. C.; FUJIWARA, R. T.; VALE, A.; DIAS, E. S.; VIEIRA, E.; DA COSTA, R. T.; MAYRINK, W.; CAMPOS NETO, A.; REED, S. Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f + MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 12, p. 1585–94, 2008.

MIURA, Y.; SHIMAZU, R.; MIYAKE, K.; AKASHI, S.; OGATA, H.; YAMASHITA, Y.; NARISAWA, Y.; KIMOTO, M. RP105 is associated with MD-1 and transmits an activation signal in human B cells. **Blood**, v. 92, n. 8, p. 2815–2822, 1998.

MOHAMED, A. J.; YU, L.; BÄCKESJÖ, C. M.; VARGAS, L.; FARYAL, R.; AINTS, A.; CHRISTENSSON, B.; BERGLÖF, A.; VIHINEN, M.; NORE, B. F.; EDVARD SMITH, C. I. Bruton's tyrosine kinase (Btk): Function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. **Immunological Reviews**, v. 228, n. 1, p. 58–73, 2009.

MOORE, K. J.; LABRECQUE, S.; MATLASHEWSKI, G. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 10, p. 4457–65, 1993.

MORAVEJ, A.; RASOULI, M.; KALANI, M.; ASAEI, S.; KIANY, S.; NAJAFIPOUR, S.; KOOHPAYEH, A.; ABDOLLAHI, A. IL-1 β (-511T/C) gene polymorphism not IL-1 β (+3953T/C) and LT- α (+252A/G) gene variants confers susceptibility to visceral leishmaniasis. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 6907–6914, 2012.

MORI, T.; IWASAKI, Y.; SEKI, Y.; ISEKI, M.; KATAYAMA, H.; YAMAMOTO, K.; TAKATSU, K.; TAKAKI, S. Lnk/Sh2b3 Controls the Production and Function of Dendritic Cells and Regulates the Induction of IFN- γ -Producing T Cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 193, n. 4, p. 1728–36, 2014.

MORIGUCHI, T.; HAMADA, M.; MORITO, N.; TERUNUMA, T.; HASEGAWA, K.; ZHANG, C.; YOKOMIZO, T.; ESAKI, R.; KURODA, E.; YOH, K.; KUDO, T.; NAGATA, M.; GREAVES, D. R.; ENGEL, J. D.; YAMAMOTO, M.; TAKAHASHI, S. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 15, p. 5715–5727, 2006.

MORITO, N.; YOH, K.; OJIMA, M.; OKAMURA, M.; NAKAMURA, M.; HAMADA, M.; SHIMOHATA, H.; MORIGUCHI, T.; YAMAGATA, K.; TAKAHASHI, S. Overexpression of MafB in podocytes protects against diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, p. 1–12, 2014.

MOTOIE, G.; FERREIRA, G. E. M.; CUPOLILLO, E.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, n. May, p. 48–59, 2013.

MÜNZ, M.; KIEU, C.; MACK, B.; SCHMITT, B.; ZEIDLER, R.; GIRES, O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. **Oncogene**, v. 23, n. 34, p. 5748–5758, 2004.

MURPHY, K. **Janeway's immunobiology**. 8. ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC., 2012.

MURPHY, K. M.; REINER, S. L. Decision making in the immune system: The lineage decisions of helper T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 12, p. 933–944, 2002.

MURPHY, P. Molecular mimicry and the generation of host defense protein diversity. **Cell**, v. Mac 26, n. 6, p. 823–826, 1993.

NASCIMENTO, P. R. P. Do; MARTINS, D. R. A.; MONTEIRO, G. R. G.; QUEIROZ, P. V.; FREIRE-NETO, F. P.; QUEIROZ, J. W.; MORAIS LIMA, Á. L.; JERONIMO, S. M. B. Association of pro-inflammatory cytokines and iron regulatory protein 2 (IRP2) with Leishmania burden in canine visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

NASCIMENTO, M. S. L.; ALBUQUERQUE, T. D. R.; NASCIMENTO, a. F. S.; CALDAS, I. S.; DO-VALLE-MATTA, M. a.; SOUTO, J. T.; TALVANI, a.; BAHIA, M. T.; GALVÃO, L. M. C.; CÂMARA, a. C. J.; GUEDES, P. M. M. Impairment of interleukin-17A expression in canine visceral leishmaniasis is correlated with reduced interferon- γ and inducible nitric oxide synthase expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 153, n. 4, p. 197–205, 2015a.

NASCIMENTO, M. S. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; RYFFEL, B.; DUTHIE, M. S.; DE JESUS, a.; DE ALMEIDA, R. P.; DA SILVA, J. S. Interleukin 17A acts synergistically with interferon to promote protection against Leishmania infantum infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 2015b.

NEWMAN DL, ABNEY M, MCPEEK MS, OBER C, C. N. The importance of genealogy in determining genetic associations with complex traits. **American Journal of Human Genetics**, v. 15, n. 5, p. 1146–1107, 2001.

NGUYEN, D. H.; HURTADO-ZIOLA, N.; GAGNEUX, P.; VARKI, A. Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 20, p. 7765–7770, 2006.

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

NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. a; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural Leishmania infection. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1-2, p. 33–47, 1992.

NUNES, C.; LIMA, V. M.; MELO, G. D.; PAULA, H. B.; PEREIRA, M. E.; TRONCO, C. M. .; HIRAMOTO, R. M.; LAURENTI, M. D.; BURATTINI, M. N. Serological , parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 402–409, 2015.

OLIVIER, M.; BROWNSEY, R. W.; REINER, N. E. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7481–5, 1992.

PACKER, L. Acide lipoic as biological antioxidant. Review article. **Free Radic Biol Med**, v. 19, n. 2, p. 227–250, 1995.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184–1191, 2010.

PANARO, M. a; BRANDONISIO, O.; CIANCIULLI, a; CAVALLO, P.; LACASELLA, V.; PARADIES, P.; TESTINI, G.; DE CAPRARIIS, D.; MITOLO, V.; OTRANTO, D. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Parasitology**, v. 136, n. 8, p. 823–831, 2009.

PARK, J. T.; KATO, M.; LANTING, L.; CASTRO, N.; NAM, B. Y.; WANG, M.; KANG, S.-W.; NATARAJAN, R. Repression of let-7 by Transforming Growth Factor- β 1-induced Lin28 up-regulates collagen expression in glomerular mesangial cells under diabetic conditions. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, n. 33, p. ajprenal.00458.2014, 2014.

PEACOCK, C. S.; COLLINS, A.; SHAW, M. a; SILVEIRA, F.; COSTA, J.; COSTE, C. H.; NASCIMENTO, M. D.; SIDDIQUI, R.; SHAW, J. J.; BLACKWELL, J. M. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. **Genetic Epidemiology**, v. 20, n. 3, p. 383–96, 2001.

PINCETIC, A.; BOURNAZOS, S.; DILILLO, D. J.; MAAMARY, J.; WANG, T. T.; DAHAN, R.; FIEBIGER, B.-M.; RAVETCH, J. V. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 15, n. 8, p. 707–716, 2014.

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

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

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P. F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine

macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 237–43, 1999.

PINHEIRO, P. H. D. C.; PINHEIRO, A. N.; FERREIRA, J. H. L.; COSTA, F. A. L.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 32–9, 2009.

PINTO, A. J.; FIGUEIREDO, M. M.; SILVA, F. L.; MARTINS, T.; MICHALIK, M. S.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 67, 2011.

PITTA, M. G. R.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A.; KOURIBA, B.; ARGIRO, L.; EL KHEIR, M.; BUCHETON, B.; MARY, C.; EL-SAFI, S. H.; DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–87, 2009.

PLANT, J.; GLYNN, a a. Locating salmonella resistance gene on mouse chromosome 1. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 37, n. 1, p. 1–6, 1979.

PRATES, D. B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, N. F.; ANDRADE, B. B.; FRANÇA-COSTA, J.; AFONSO, L.; CLARÊNCIO, J.; MIRANDA, J. C.; BOZZA, P. T.; DOS REIS, G.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BORGES, V. M.; BARRAL, A. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 3, p. 575–82, 2011.

PRICE, A.; PATTERSON, N. J.; PLENGE, R. M.; WEINBLATT, M. E.; SHADICK, N. a; REICH, D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. **Nature Genetics**, v. 38, n. 8, p. 904–9, 2006.

PRATES, D. B. **O cuspe da morte**. Disponível em: <http://limilip.blogspot.com.br/2011_07_01_archive.html>. Acesso em: 15 dez. 2015.

PROLO, C.; ÁLVAREZ, M. N.; RADI, R. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. **BioFactors**, v. 40, n. 2, p. 215–225, 2014.

QUILEZ, J.; MARTÍNEZ, V.; WOOLLIAMS, J. a.; SANCHEZ, A.; PONG-WONG, R.; KENNEDY, L. J.; QUINNELL, R. J.; OLLIER, W. E. R.; ROURA, X.; FERRER, L.; ALTET, L.; FRANCINO, O. Genetic control of canine leishmaniasis: genome-wide association study and genomic selection analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35349, 2012.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; KAYE, P. M.; SHAW, M. a.; DYE, C.; DAY, M. J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 3-4, p. 161–168, 2003a.

QUINNELL, R. J.; KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; COURTENAY, O.; DYE, C.; GARCEZ, L. M.; SHAW, M.-A.; CARTER, S. D.; THOMSON, W.; OLLIER, W. E. R. Susceptibility to visceral leishmaniasis

in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, n. 1, p. 23–28, 2003b.

RAFATI, S.; NAKHAE, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; DARABI, H.; ERAVANI, D.; SANOS, S.; KAYE, P.; TAGHIKHANI, M.; JAMSHIDI, S.; RAD, M. A. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. **Vaccine**, v. 23, n. 28, p. 3716–3725, 2005.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. a.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. a. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3-4, p. 102–116, 2006.

REIS E SOUSA, C.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, n. 4, p. 392–399, 1999.

RIBEIRO, E. S. **Polimorfismos nos genes *slc11a1* e *dla-drb1* e susceptibilidade de cães à leishmaniose**. 2011. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, 2011.

RIBEIRO, R. R.; MOURA, E. P.; PIMENTEL, V. M.; SAMPAIO, W. M.; SILVA, S. M.; SCHETTINI, D. a; ALVES, C. F.; MELO, F. a; TAFURI, W. L.; DEMICHELI, C.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; MICHALICK, M. S. M. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2564–72, 2008.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. D. O.; VITORIANO-SOUSA, J.; COURA, W.; CORRE, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; LEO, S.; LANA, M. De; GONTIJO, N. F.; JOSE, M.; GIUNCHETTI, C.; REIS, A. B. Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. **Plos One**, v. 7, n. 11, 2012.

RODRIGUES, C. A. T.; BATISTA, L. F. D. S.; FILHO, R. S. T.; SANTOS, C. D. S.; PINHEIRO, C. G.; ALMEIDA, T. F. De; FREITAS, L. A. R. De; VERAS, P. S. T. IFN- γ expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi* promastigote stimulation in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 3-4, p. 382–388, 2009.

RODRIGUES, C. A. T.; BATISTA, L. F. D. S.; TEIXEIRA, M. C. A.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, P. O. M.; DE SÁ OLIVEIRA, G. G.; FREITAS, L. A. R. De; VERAS, P. S. T. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Veterinary Parasitology**, 2007.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; FERNÁNDEZ-BELLÓN, H.; RAMIS, A.; FERRER, L.; ALBEROLA, J.; SOLANO-GALLEGU, L. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, n. 3-4, p. 190–8, 2007a.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGU, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 683–93, 2007b.

ROHOUSOVA, I.; LIPOLDOVA, M.; VOLF, P. Modulation of murine cellular immune responses and cytokine production by sand fly saliva. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 12, p. 469–473, 2005.

ROHOUSOVA, I.; OZENSOY, S.; OZBEL, Y.; VOLF, P. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. **Parasitology**, v. 130, n. Pt 5, p. 493–499, 2005.

ROSSI, C. N. **Avaliação da imunidade celular na pele de cães naturalmente infectados com leishmania (leishmania) infantum chagasi e sua correlação com transmissibilidade ao vetor**. 2013. 89f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, 2013.

SACCHI, L.; CALVI, L. E.; KRAMER, L. H.; FERROGLIO, E.; GRANDI, G.; CLEMENTI, E.; CORONA, S. The intradermal Leishmanin reaction induces antigen-specific maturation of canine dendritic cells with up-regulation of MHCII synthesis and expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, n. 1, p. 17–24, 2006.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 1041–1047, 2002.

SACRAMENTO, L. A.; CUNHA, F. Q.; DE ALMEIDA, R. P.; DA SILVA, J. S.; CARREGARO, V. Protective role of 5-lipoxygenase during Leishmania infantum infection is associated with Th17 subset. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

SAGARDOY, A.; MARTINEZ-FERRANDIS, J. I.; ROA, S.; BUNTING, K. L.; AZNAR, M. A.; ELEMENTO, O.; SHAKNOVICH, R.; FONTÁN, L.; FRESQUET, V.; PEREZ-ROGER, I.; ROBLES, E. F.; DE SMEDT, L.; SAGAERT, X.; MELNICK, A.; MARTINEZ-CLIMENT, J. a. Downregulation of FOXP1 is required during germinal center B-cell function. **Blood**, v. 121, n. 21, p. 4311–4320, 2013.

SALDARRIAGA, O. a.; PEREZ, L. E.; TRAVI, B. L.; MELBY, P. C. Selective enhancement of the type 1 cytokine response by expression of a canine interleukin (IL)-12 fused heterodimeric DNA. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3-4, p. 377–388, 2006.

SALVADORI, M. Update on immunoglobulin A nephropathy, Part I: Pathophysiology. **World Journal of Nephrology**, v. 4, n. 4, p. 455, 2015.

- SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; ALBEROLA, J.; RODRIGUEZ-CORTÉS, a.; OJEDA, a.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMON, M.; SANCHEZ, a.; FRANCINO, O. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, n. 1-2, p. 168–175, 2008a.
- SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; SANCHEZ, a.; FRANCINO, O. Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. **The Journal of Heredity**, v. 96, n. 7, p. 755–8, 2005.
- SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; UTZET-SADURNI, M.; GIGER, U.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 39, n. 3, p. 36, 2008b.
- SCHMIDL, C.; HANSMANN, L.; LASSMANN, T.; BALWIERZ, P. J.; KAWAJI, H.; ITOH, M.; KAWAI, J.; NAGAO-SATO, S.; SUZUKI, H.; ANDREESEN, R.; HAYASHIZAKI, Y.; FORREST, A. R. R.; CARNINCI, P.; HOFFMANN, P.; EDINGER, M.; REHLI, M. The enhancer and promoter landscape of human regulatory and conventional T-cell subpopulations. **Blood**, v. 123, n. 17, p. 68–79, 2014.
- SCHMIDT, D.; MÜLLER, S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2872–7, 2002.
- SCIANIMANICO, S.; DESROSIERS, M.; DERMINE, J. F.; MÉRESSE, S.; DESCOTEAUX, a.; DESJARDINS, M. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. **Cellular Microbiology**, v. 1, p. 19–32, 1999.
- SETO, S.; TSUJIMURA, K.; KOIDE, Y. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 12, n. 4, p. 407–20, 2011.
- SHI, C.; SAKUMA, M.; MOOROKA, T.; LISCOE, A.; GAO, H.; CROCE, K. J.; SHARMA, A.; KAPLAN, D.; GREAVES, D. R.; WANG, Y.; SIMON, D. I. Down-regulation of the forkhead transcription factor *Foxp1* is required for monocyte differentiation and macrophage function. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4699–711, 2008.
- SILVA, K. L. O.; DE ANDRADE, M. M. C.; MELO, L. M.; PEROSSO, J.; VASCONCELOS, R. O.; MUNARI, D. P.; LIMA, V. M. F. CD4+FOXP3+ cells produce IL-10 in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 313–318, 2014.
- SILVA, L. C.; CASTRO, R. S.; FIGUEIREDO, M. M.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **International Journal of Experimental Pathology**, p. 133–143, 2013.
- SILVEIRA, F. T.; CARNEIRO, L. a; RAMOS, P. K. S.; CHAGAS, E. J.; LIMA, L. V. R.; CAMPOS, M. B.; LAURENTI, M. D.; GOMES, C. M. C.; CORBETT, C. E. P. A cross-sectional study on canine *Leishmania* (L.) *infantum* chagasi infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of

specific IgG-antibody response than delayed-type hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1513–22, 2012.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; PEREIRA, E. a.; DE SOUZA, A. a. a.; CAMPOS, M. B.; CHAGAS, E. J.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. A longitudinal study on the transmission dynamics of human Leishmania (Leishmania) infantum chagasi infection in Amazonian Brazil, with special reference to its prevalence and incidence. **Parasitology Research**, v. 104, n. 3, p. 559–567, 2009.

SIMS, T. N.; SOOS, T. J.; XENIAS, H. S.; DUBIN-THALER, B.; HOFMAN, J. M.; WAITE, J. C.; CAMERON, T. O.; THOMAS, V. K.; VARMA, R.; WIGGINS, C. H.; SHEETZ, M. P.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L. Opposing effects of PKC Θ and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 773–785, 2007.

SOARES, M.; MORAES, J.; MORAES, F. Renal involvement in canine leishmaniasis: a morphological and immunohistochemical study. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 785–790, 2009.

SOARES, R. P. P.; MACEDO, M. E.; ROPERT, C.; GONTIJO, N. F.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T.; PIMENTA, P. F. P.; TURCO, S. J. Leishmania chagasi: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 213–24, 2002.

SOARES, R.; PAULA, A.; SOUZA, A.; PRATES, D. B.; OLIVEIRA, C. I. De; BARRAL-NETTO, M.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, A. Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports 3, Article number: 2352 (2013)**, v. 3, p. 2352, 2013.

SOLANO-GALLEGGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, a.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7–12, 2004.

SOLANO-GALLEGGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1-2, p. 37–45, 2000.

SOLANO-GALLEGGO, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001a.

SOLANO-GALLEGGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGGO, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 265–276, 2001b.

SOLCÀ, M. D. S.; BASTOS, L. A.; GUEDES, C. E. S.; BORDONI, M.; BORJA, L. S.; LARANGEIRA, D. F.; DA SILVA ESTRELA TUY, P. G.; AMORIM, L. D. A. F.; NASCIMENTO, E. G.; DE SÁ OLIVEIRA, G. G.; DOS-SANTOS, W. L. C.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103635, 2014.

SOUZA, C. C.; BARRETO, T. D. O.; DA SILVA, S. M.; PINTO, A. W. J.; FIGUEIREDO, M. M.; FERREIRA ROCHA, O. G.; CANGUSSÚ, S. D.; TAFURI, W. L. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 4, p. 260–270, 2014.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 38, p. 547–564, 2007.

SUMAGIN, R.; PARKOS, C. a. Epithelial adhesion molecules and the regulation of intestinal homeostasis during neutrophil transepithelial migration. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 1-2, p. e969100, 2015.

SUTTER, N. B.; EBERLE, M. a; PARKER, H. G.; PULLAR, B. J.; KIRKNESS, E. F.; KRUGLYAK, L.; OSTRANDER, E. a. Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*. **Genome Research**, v. 14, n. 12, p. 2388–96, 2004.

TAKAKI, S.; TEZUKA, Y.; SAUER, K.; KUBO, C.; KWON, S.-M.; ARMSTEAD, E.; NAKAO, K.; KATSUKI, M.; PERLMUTTER, R. M.; TAKATSU, K. Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice overexpressing Lnk adaptor protein. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 2, p. 703–710, 2003.

TIMMANN, C.; THYE, T.; VENS, M.; EVANS, J.; MAY, J.; EHMEN, C.; SIEVERTSEN, J.; MUNTAU, B.; RUGE, G.; LOAG, W.; ANSONG, D.; ANTWI, S.; ASAFO-ADJEI, E.; NGUAH, S. B.; KWAKYE, K. O.; AKOTO, A. O. Y.; SYLVERKEN, J.; BRENDDEL, M.; SCHULDT, K.; LOLEY, C.; FRANKE, A.; MEYER, C. G.; AGBENYEGA, T.; ZIEGLER, A.; HORSTMANN, R. D. Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. **Nature**, v. 489, n. 7416, p. 443–446, 2012.

TODOLÍ, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; OJEDA, A.; QUINTANA, J.; LLORET, A.; ROURA, X.; ALBEROLA, J.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. Anti-Leishmania IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 17–23, 2009.

TRIFARI, S.; SITIA, G.; AIUTI, A.; SCARAMUZZA, S.; MARANGONI, F.; GUIDOTTI, L. G.; MARTINO, S.; SARACCO, P.; NOTARANGELO, L. D.; RONCAROLO, M.-G.; DUPRÉ, L. Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4+ and CD8+ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 10, p. 7451–61, 2006.

UENO, N.; BRATT, C. L.; RODRIGUEZ, N. E.; WILSON, M. E. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 1827–41, 2009.

URBACH, A.; YERMALOVICH, A.; ZHANG, J.; SPINA, C. S.; ZHU, H.; PEREZ-ATAYDE, A. R.; SHUKRUN, R.; CHARLTON, J.; SEBIRE, N.; MIFSUD, W.; DEKEL, B.; PRITCHARD-JONES, K.; DALEY, G. Q. Lin28 sustains early renal progenitors and induces Wilms tumor. **Genes & Development**, p. 971–982, 2014.

UTSUNOMIYA, Y. T.; RIBEIRO, É. S.; QUINTAL, A. P. N.; SANGALLI, J. R.; GAZOLA, V. R.; PAULA, H. B.; TRINCONI, C. M.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; SONSTEGARD, T. S.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M. Genome-wide scan for Visceral leishmaniasis in mixed-breed dogs identifies candidate genes involved in T helper cells and macrophage signaling. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. e0136749, 2015.

VIDAL, S. M.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. **Cell**, v. 73, p. 469–485, 1993.

VIDAL, S.; TREMBLAY, M. L.; GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; SEBASTIANI, G.; MALO, D.; SKAMENE, E.; OLIVIER, M.; JOTHY, S.; GROS, P. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 3, p. 655–66, 1995.

VON ANDRIAN, U. H.; MEMPEL, T. R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 11, p. 867–878, 2003.

WAGNER, J. L.; BURNETT, R. C.; STORB, R. Organization of the canine major histocompatibility complex: Current perspectives. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 35–38, 1999.

WANG, W. Y.; BARRATT, B. J.; CLAYTON, D. G.; TODD, J. a. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. **Nature reviews.Genetics**, v. 6, n. 2, p. 109–118, 2005.

WEIDINGER, S.; GIEGER, C.; RODRIGUEZ, E.; BAURECHT, H.; MEMPEL, M.; KLOPP, N.; GOHLKE, H.; WAGENPFEIL, S.; OLLERT, M.; RING, J.; BEHRENDT, H.; HEINRICH, J.; NOVAK, N.; BIEBER, T.; KRÄMER, U.; BERDEL, D.; VON BERG, A.; BAUER, C. P.; HERBARTH, O.; KOLETZKO, S.; PROKISCH, H.; MEHTA, D.; MEITINGER, T.; DEPNER, M.; VON MUTIUS, E.; LIANG, L.; MOFFATT, M.; COOKSON, W.; KABESCH, M.; WICHMANN, H.-E.; ILLIG, T. Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 8, p. e1000166, 2008.

WEREN, R. D. A.; VENKATACHALAM, R.; CAZIER, J.-B.; FARIN, H. F.; KETS, C. M.; DE VOER, R. M.; VREEDE, L.; VERWIEL, E. T. P.; VAN ASSELDONK, M.; KAMPING, E. J.; KIEMENEY, L. a; NEVELING, K.; ABEN, K. K. H.; CARVAJAL-CARMONA, L.; NAGTEGAAL, I. D.; SCHACKERT, H. K.; CLEVERS, H.; VAN DE WETERING, M.; TOMLINSON, I. P.; LIGTENBERG, M. J. L.; HOOGERBRUGGE, N.; GEURTS VAN KESSEL, A.; KUIPER, R. P. Germline deletions in the tumour suppressor gene FOCAD are associated with polyposis and colorectal cancer development. **The Journal of Pathology**, v. 236, n. 2, p. 155–64, 2015.

WHITEMAN, H. J.; FARRELL, P. J. RUNX expression and function in human B cells. **Critical Reviews Eukaryot Gene Expression**, v. 16, n. 1, p. 31–44, 2006.

WHO. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. 22–26, 2010.

WHO, W. H. O. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 23 set. 2015.

WILSON, M. E.; ANDERSEN, K. a.; BRITIGAN, B. E. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5133–5141, 1994.

WTCCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**, v. 447, n. 7145, p. 661–78, 2007.

YAMADORI, T.; BABA, Y.; MATSUSHITA, M.; HASHIMOTO, S.; KUROSAKI, M.; KUROSAKI, T.; KISHIMOTO, T.; TSUKADA, S. Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab, the Btk-SH3 domain-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p. 6341–6, 1999.

YAMAGUCHI, Y.; FUJIO, K.; SHODA, H.; OKAMOTO, A.; TSUNO, N. H.; TAKAHASHI, K.; YAMAMOTO, K. IL-17B and IL-17C are associated with TNF- α production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 10, p. 7128–7136, 2007.

YAMAJI, K.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, H.; SATAKE, K.; HORIKOSHI, S.; NOVAK, J.; TOMINO, Y. The kinetics of glomerular deposition of nephritogenic IgA. **PloS One**, v. 9, n. 11, p. e113005, 2014.

YAN, X.; LIU, Z.; CHEN, Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 41, n. 4, p. 263–272, 2009.

10 ANEXOS

ANEXO A - FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA – PROJETO GWAS LVC

N°

DATA: _____

Nome do proprietário: _____

Endereço: _____

Município: _____ Tel.: () _____ Tempo de residência: _____

Nome: _____ Raça: _____ Idade: _____ Sexo: (M) (F)

Escore corporal: _____ Temp (°C): _____ FC: _____ FR: _____ Pulso: _____

Vai ao veterinário?	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Vacinado contra LVC?	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Tratado contra LVC?	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Usa coleira inseticida?	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Tem Citronela em casa?	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Outros animais?	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Higiene do local?	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Anemia (mucosa)	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Linfonodo aumentado	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Baço aumentado	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Fígado aumentado	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Alopecia	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Dermatite	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Hiperqueratose	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Onicogribose	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Secreção ocular	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
Úlcera na córnea	SIM ()	NÃO ()	Obs.:
ELISA	Positivo ()	Negativo ()	Título:
RIFI	Positivo ()	Negativo ()	Título:
PARASITOLÓGICO:	Positivo ()	Negativo ()	Obs.:
HEMOGRAMA	SIM ()	NÃO ()	Resultado:
CREATININA E URÉIA	SIM ()	NÃO ()	Resultado:
AST, ALT e FA	SIM ()	NÃO ()	Resultado:

OUTRAS DOENÇAS: _____

OBSERVAÇÕES: _____

Med. Veterinário _____

**ANEXO B – LEITURA DE TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA 72 HORAS APÓS A
INOCULAÇÃO DA LEISHMANINA**

Fonte: (BATISTA, 2016).

Legenda: Observação de eritema medindo 20x15 mm no ponto de inoculação da leishmanina na pele da região abdominal de um cão de área endêmica para leishmaniose visceral canina do estado de São Paulo.