



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM IMUNOLOGIA, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**IZABELLY FÁVERO SOUZA LIMA**

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA, PRODUÇÃO DE CITOCINAS  
E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM CAMUNDONGOS BALB/c  
SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA E AO IMPLANTE AUTÓGENO DE  
BAÇO APÓS INFECÇÃO COM *Leishmania chagasi*.**

Juiz de Fora - MG  
2010

**IZABELLY FÁVERO SOUZA LIMA**

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA, PRODUÇÃO DE CITOCINAS  
E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM CAMUNDONGOS BALB/c  
SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA E AO IMPLANTE AUTÓGENO DE  
BAÇO APÓS INFECÇÃO COM *Leishmania chagasi*.**

**Dissertação de Mestrado do Curso de  
Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Biológicas na área  
de Imunologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira**

Juiz de Fora - MG  
2010

**IZABELLY FÁVERO SOUZA LIMA**

**AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA, PRODUÇÃO DE CITOCINAS  
E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM CAMUNDONGOS BALB/c  
SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA E AO IMPLANTE AUTÓGENO DE  
BAÇO APÓS INFECÇÃO COM *Leishmania chagasi*.**

Dissertação de Mestrado do Curso de  
Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências Biológicas na área  
de Imunologia.

Aprovado em: 17/06/2010

**Banca examinadora**

---

**Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira  
Universidade Federal de Juiz de Fora - MG**

---

**Prof. Dr. Elaine Soares Coimbra  
Universidade Federal de Juiz de Fora – MG**

---

**Prof. Dr. Maria Aparecida de Souza  
Universidade Federal de Uberlândia - MG**

## DEDICATÓRIA

A Deus, por me dar sua benção e toda força e tranquilidade para superar as dificuldades inerentes da vida.

*A minha mãe, ao meu pai (in memoriam) e aos meus irmãos pelo apoio, incondicional, à minha perseverança para chegar até aqui, sempre me encorajando nos momentos difíceis.*

*Ao Alessandro, por todo o amor e carinho, principalmente pela compreensão.*

*Ao meu Tio Manoel, pelo grande apoio.*

*As amigas da república Bia, Mariana, Marina e Nádia pela amizade e companheirismo que marcaram este percurso.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço, ao meu orientador, Professor Doutor Henrique Couto Teixeira, por todo apoio e empenho na elaboração deste trabalho, pela disponibilidade pessoal e transmissão de conhecimentos.*

*Agradeço a todos os amigos do laboratório pela amizade e apoio em todos os momentos, especialmente a Alice que sempre esteve comigo me ajudando durante e após os experimentos.*

*Outra pessoa que sem dúvida alguma não poderia de deixar de agradecer, pelo apoio incondicional ao meu desenvolvimento acadêmico, científico e pessoal. A professora e amiga CIDA. Obrigada pelo carinho e dedicação dispensados à mim desde a Iniciação científica; sem a senhora não seria possível ter realizado este trabalho.*

## RESUMO

O implante autógeno de baço é uma opção para a preservação das funções esplênicas após esplenectomia total. Indivíduos esplenectomizados são mais susceptíveis a infecções por diversas bactérias, havendo poucos relatos sobre a importância do baço na resistência a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários unicelulares flagelados, que sobrevivem em macrófagos após a fagocitose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da esplenectomia e de implantes esplênicos autógenos na carga parasitária e produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-17 no fígado e baço de camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com  $10^6$  promastigotas de *Leishmania chagasi*. A presença de infiltrados inflamatórios no fígado dos animais infectados foi também avaliada em cortes de tecidos incluídos em parafina corados com hematoxilina-eosina. Camundongos BALB/c foram divididos nos seguintes grupos: esplenectomizado (SP), esplenectomizado e autotransplantado em grande omento (AT), e controle operado (CT). Trinta dias após a realização da cirurgia os animais foram infectados com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi*. Após trinta dias da infecção os animais foram eutanasiados, tendo o baço e fígado coletados, macerados e usados para avaliar a carga parasitária pelo método da diluição limitante e os sobrenadantes dos macerados utilizados para a produção de citocinas pelo método de ELISA. Os resultados obtidos mostram que os animais esplenectomizados apresentam carga parasitária maior no fígado quando comparados aos grupos CT e AT, coincidindo também com a maior produção de IL-10. Por outro lado, animais esplenectomizados tiveram menor produção de IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , quando comparados aos animais controle e autotransplantado em grande omento. Já a IL-17 foi produzida em maior quantidade no fígado dos animais esplenectomizados. Nos animais SP e AT foram observados poucos infiltrados de células mononucleares no fígado, em comparação aos animais CT, que mostraram um acúmulo moderado de infiltrados no fígado. Os resultados obtidos sugerem a importância do baço para o desenvolvimento de uma resposta imune mais efetiva à infecção com *L. chagasi*. Isto correlaciona com a produção elevada de citocinas pro-inflamatórias com perfil Th1, e maior recrutamento de células mononucleares para o sítio de infecção. Portanto a esplenectomia pode interferir no padrão de resposta imunológica dos animais infectados com *L. chagasi*, levando a maior suscetibilidade a infecção.

**Palavras-chave:** esplenectomia, *Leishmania*, citocinas, carga parasitária.

## ABSTRACT

The autogenous implant of spleen is an option for the preservation of splenic function after total splenectomy. Although it has been demonstrated that splenectomized individuals are more sensitive to infections by various bacteria, few reports exist on the importance of the spleen in resistance to infection by *Leishmania* sp. Leishmaniasis is an infectious disease caused by a unicellular flagellate protozoan, which survives in macrophages after phagocytosis. The objective of this work was to evaluate the influence of splenectomy and autogenous implant of spleen on the parasitic load and in the production of IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-17 in the liver and spleen of BALB/c mice infected intraperitoneally (i.p.) with  $10^6$  promastigotes of *L. chagasi*. Presence of inflammatory infiltrate in the liver of the infected animals was also evaluated, through hematoxylin-eosin staining of tissue cuts embedded in paraffin. BALB/c mice were divided into the following groups: splenectomized (SP), splenectomized and autotransplanted in the greater omentum (AT), and control group with sham operation (CT). Thirty days after the surgery the animals were infected i.p. with  $10^6$  promastigotes of *L. chagasi*. After thirty days of infection the animals were euthanized, the spleen and the liver collected, macerated, and used for evaluation of the parasitic load through the technique of limiting dilution, and for production of cytokines through the method of ELISA. The results obtained show that the splenectomized animals presented a larger parasitic load when compared to the CT and AT groups, having also a greater production of IL-10 in the liver. On the other hand, the CT and AT groups showed greater production of IFN- $\gamma$ , IL-12 and TNF- $\alpha$  than the splenectomized group. The production of IL-17 was greater in the liver of the splenectomized animals. In the splenectomized animals few infiltrates of mononuclear cells were observed, in comparison to the animals with intact spleen, which showed a moderate accumulation of mononuclear cells in the liver. The results obtained suggest that the presence of the spleen favors the development of a more effective immune response to infection with *L. chagasi*, this being correlated with an elevated production of pro-inflammatory cytokines with Th1 profile, and greater recruitment of mononuclear cells to the infection site. However, splenectomy can interfere in the pattern of immunologic response of animals infected with *Leishmania chagasi*, leading to a greater sensitivity to the infection.

Keywords: splenectomy, *Leishmania*, cytokines, parasite load.

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

<b>Figura 1</b>	Estrutura e localização do baço.....	18
<b>Figura 2</b>	Formas promastigota e amastigota do protozoário <i>Leishmania</i> .....	20
<b>Figura 3</b>	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .....	23
<b>Figura 4</b>	Técnica cirúrgica- cirurgia simulada.....	42
<b>Figura 5</b>	Técnica cirúrgica – esplenectomia.....	42
<b>Figura 6</b>	Técnica cirúrgica - transplante autólogo de baço em grande omento.....	42
<b>Figura 7</b>	Estimativa da carga parasitária nos macerados de fígado dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	46
<b>Figura 8</b>	Produção de IFN- $\gamma$ nos sobrenadantes dos macerados de fígado dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	47
<b>Figura 9</b>	Produção de IL-12 nos sobrenadantes dos macerados de fígado dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	48
<b>Figura 10</b>	Produção de TNF- $\alpha$ nos sobrenadantes dos macerados de fígado dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	49
<b>Figura 11</b>	Produção de IL-10 nos sobrenadantes dos macerados de fígado dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	50
<b>Figura 12</b>	Produção de IL-17 nos sobrenadantes dos macerados de fígado dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	51
<b>Figura 13</b>	Estimativa da carga parasitária nos macerados de baço dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	52
<b>Figura 14</b>	Produção de citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-10) nos sobrenadantes dos macerados de fígado dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	53
<b>Figura 15</b>	Fotografia das lâminas de tecido hepático dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	55
<b>Tabela 1</b>	Número de áreas de infiltrados de células mononucleares no fígado dos animais infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	54



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABL	Anfotericina B lipossomal
APC	Célula apresentadora de antígenos
AT	Grupo autotransplantado
BHI	Brain heart infusion (infusão de cérebro e coração)
CT	Grupo controle — cirurgia simulada
CD	“cluster” de diferenciação
CR1	Receptor do complemento tipo 1
CR3	Receptor do complemento tipo 3
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
GP	Glicoproteína
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23
iNOS	Síntese de óxido nítrico induzida
i.p.	Intraperitonal
IRN	Intermediários reativos de nitrogênio
IRO	Intermediários reativos de oxigênio
KD	kilodáltons
LB	Linfócito B
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Linfócito T
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LTc	Linfócito T citotóxicos

LTh	Linfócito T helper
LTh1	Linfócito T helper 1
LTh2	Linfócito T helper 2
LTh17	Linfócito T helper 17
LTreg	Linfócito T regulatório
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
LVC	Leishmaniose visceral canina
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MMM	Macrófagos metalofílicos marginais
MZM	Macrófagos da zona marginal
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintase tipo 2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PALS	Bainha linfocítica periarteriolar
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SP	Grupo esplenectomizado
SRE	Sistema retículo endotelial
TGF- $\beta$	Fator $\beta$ de transformação do crescimento
TLR	Receptores Toll-like
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
ZM	Zona marginal

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 O baço .....	13
1.2 Leishmaniose: agente etiológico.....	19
1.3 Leishmaniose: vetores e hospedeiros.....	20
1.4 Leishmaniose: ciclo biológico.....	22
1.5 Leishmaniose visceral: epidemiologia.....	23
1.6 Leishmaniose: diagnóstico.....	26
1.7 Leishmaniose: tratamento.....	28
1.8 Leishmaniose: resposta imunológica.....	30
1.8.1 Interação inicial e fagocitose.....	30
1.8.2 Imunidade inata e adaptativa na leishmaniose .....	30
1.9 Mecanismos patogênicos nos órgãos envolvidos.....	36
1.10 Mecanismos de evasão.....	38
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	40
2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
<b>3. MATERIAL e MÉTODOS</b> .....	41
3.1 Animais.....	41
3.2 Procedimento cirúrgico.....	41
3.3 Parasitos e infecção.....	43
3.4 Avaliação da carga parasitária.....	43
3.5 Análise da produção de citocinas.....	43
3.6 Histologia convencional.....	44

3.7 Análise estatística.....	45
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
4.1 Estimativa de parasitos viáveis no macerado de fígado de camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania chagasi</i> .....	46
4.2 Quantificação de IFN- $\gamma$ em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com <i>Leishmania chagasi</i> .....	47
4.3 Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com <i>Leishmania chagasi</i> .....	48
4.4 Quantificação de TNF- $\alpha$ em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com <i>Leishmania chagasi</i> .....	49
4.5 Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com <i>Leishmania chagasi</i> .....	50
4.6 Quantificação de IL-17 em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com <i>Leishmania chagasi</i> .....	51
4.7 Estimativa da carga parasitária nos macerados de baço e em fragmentos esplênicos transplantados após 30 dias de infecção com <i>Leishmania chagasi</i> .....	52
4.8 Quantificação de IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-10 em sobrenadantes de macerados de baço e em fragmentos esplênicos transplantados de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com <i>Leishmania chagasi</i> .....	53
4.9 Histologia do tecido hepático de camundongos BALB/c após 30 dias de infecção com <i>Leishmania chagasi</i> .....	54
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O baço

As primeiras citações sobre baço se iniciaram com Hipócrates e se intensificaram com Galeno (130 a 200 d.C.) que afirmou ser o baço um órgão misterioso com funções a serem descobertas (PETROIANU, 2003a). Kyber (1870) estabeleceu a anatomia compartimental do baço em humanos, cães, cavalos e coelhos como sendo dividido em diversos segmentos por septos fibrosos e que estes eram irrigados por sua artéria própria (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Considerado um órgão misterioso e por ter sua função pouco conhecida, acreditava-se que sua remoção cirúrgica conseqüente ao trauma ou outras doenças, não provocaria dano maior ao paciente (PISTERS, 1994). No entanto, em 1919, Morris e Bullock sugeriram que a ausência do baço poderia estar associada ao aumento da susceptibilidade à infecção, incentivando a pesquisa sobre o tema. Estes pesquisadores advertiram que a morte que segue à infecção pós-esplenectomia em seres humanos pode ter relação com os fatos observados experimentalmente e que os cirurgiões deveriam ter maior cautela na remoção do baço.

Em 1929, O'Donnel publicou o primeiro relato de caso de infecção pós-esplenectomia. Somente a partir da publicação de King e Shumacker (1952) na qual foram relatados casos de sepse fulminante pós-esplenectomia, é que o baço passou a ter despertada sua importância quanto à conservação. Dando continuidade aos estudos sobre as funções do baço, Singer (1973) verificou que a incidência de infecção grave e fatal é maior nos indivíduos esplenectomizados do que na população em geral. Coil (1978) demonstrou em seu estudo que animais esplenectomizados expostos a uma suspensão aerossol de *Streptococcus pneumoniae* são mais susceptíveis a infecção quando comparados aos animais que apresentavam o baço intacto. Assim, desde o conhecimento sobre o aumento do risco de infecção e septicemia relacionado à esplenectomia, os estudos sobre o baço tornaram-se progressivamente mais freqüentes.

O baço constitui parte integral da resposta imune do hospedeiro. É o maior órgão linfóide secundário, localizado no quadrante superior esquerdo do abdome

(Fig. 1), pesando cerca de 150 gramas em adultos humanos. Macroscopicamente, o baço pode ser dividido em uma porção denominada polpa vermelha, rica em eritrócitos e macrófagos e outra denominada polpa branca onde se encontram folículos de tecido linfóide ricos em linfócitos T e B, plasmócitos, reticulócitos, fibrócitos e células dendríticas (Fig. 1). É na polpa vermelha que o sangue é filtrado, enquanto a polpa branca é responsável pela defesa imunológica (PEREIRA *et al.*, 1999). As áreas especializadas com acúmulos de linfócitos são conhecidas como polpa branca, contendo linfócitos B que se acumulam em folículos e uma bainha linfocítica periarteriolar (PALS), contendo linfócitos T que se acumulam ao redor de uma arteríola central. A polpa branca é separada da polpa vermelha rica em eritrócitos pela zona marginal (ZM) (CESTA, 2006). A ZM do baço de camundongos constitui-se de células reticulares, linfócitos B, células dendríticas, macrófagos metalofílicos marginais (MMM) e macrófagos da zona marginal (MZM). Os MMM estão localizados na borda interna da ZM, adjacente a polpa branca, enquanto os MZM estão presentes no limite externo da ZM, adjacente a polpa vermelha (ATO *et al.*, 2004; GEIJTENBEEK *et al.*, 2002).

Na ZM, o sangue passa pelas arteríolas terminais, que se abrem nos sinusóides, onde passa lentamente favorecendo com que as partículas transportadas pela circulação sanguínea possam ser removidas pelos MZM e células dendríticas com alta eficiência. Adicionalmente à remoção dos antígenos da circulação, a ZM também tem um papel importante no direcionamento dos linfócitos que transitam do sangue para a polpa branca. Subpopulações de células dendríticas especializadas são encontradas nesta estrutura, ponto no qual os antígenos podem ser capturados e onde as respostas de células T e B podem ser moduladas (ENGWERDA *et al.*, 2004). Essa organização estrutural é controlada por quimiocinas específicas, moléculas de adesão e receptores de endereçamento, fundamentais para permitir o funcionamento do sistema imune, que é dependente da interação entre as várias populações celulares que compõem o sistema imunológico e o órgão (MEBIUS e KRAAL, 2005).

A função crucial de um órgão linfóide secundário é iniciar a resposta imune. O baço recebe células oriundas de outras regiões do corpo, denominadas apresentadoras de antígenos (APC). Dentre estas células estão os macrófagos, linfócitos B e células dendríticas, capazes de apresentar antígenos associados a

moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, podendo ativar linfócitos T CD4+ (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

O baço tem importante papel na defesa do organismo devido a seus mecanismos de filtração e fagocitose, além da produção de fatores do complemento e imunoglobulinas, em especial a IgM. É responsável pela fagocitose e depuração de partículas, bactérias, vírus, fungos e parasitos da corrente sanguínea (MARQUES *et al.*, 2002b).

Além disso, o baço funciona como um centro hematopoético até ao final da vida fetal. Após o nascimento a medula óssea torna-se o principal local deste processo (MOORE *et al.*, 2004).

O baço é responsável pela produção de tuftsin, um tetrapeptídeo circulante que atua estimulando a atividade e migração de células fagocíticas. Tal função é particularmente importante no período inicial de invasão bacteriana e na prevenção da infecção através da manutenção de um nível adequado de fagocitose. Também produz a properdina, molécula responsável por estabilizar a C3 convertase da via alternativa do sistema complemento, favorecendo a lise mediada pelo complemento e a produção de opsoninas que atuam na opsonização, facilitando a fagocitose de bactérias e células alteradas (WAISBERG *et al.*, 1993).

Outra importante função atribuída ao baço é a regulação do metabolismo lipídico. Acredita-se que o tecido esplênico atue como um grande filtro biológico captando e destruindo o LDL - colesterol, através de receptores na membrana de macrófagos, controlando assim os seus níveis e os de colesterol total (FATOUROS *et al.*, 1995). Entretanto, Rezende e colaboradores (2007) sugeriram em seu trabalho que o baço parece não participar da regulação dos níveis de lipídios plasmáticos em camundongos BALB/c.

Mesmo com todas as evidências científicas de que o baço é um órgão importante, tanto na defesa orgânica quanto por suas múltiplas funções metabólicas e hematológicas, a maior parte dos médicos continua indicando a retirada completa desse órgão para tratar ou controlar distúrbios metabólicos dislipidêmicos, como a doença de Gaucher, moléstias hematológicas, como a hepatoesplenomegalia e afecções oncológicas, destacando-se as leucoses (PETROIANU *et al.*, 2008b).

Nos serviços de emergência, observa-se que o baço é um dos órgãos intra-abdominais mais freqüentemente lesados, principalmente em crianças vítimas de traumatismos abdominais contusos. Muitas vezes, a gravidade do quadro ou a

inexperiência do cirurgião leva à realização de esplenectomias totais (RESENDE e PETROIANU, 2001). Pacientes vítimas de traumatismos esplênicos e esplenectomizados assumem um estado de asplenia e conseqüentemente adquirem uma grande susceptibilidade a infecções que podem ser progressivas e fatais (TIMENS e LEEMANS, 1992).

Estudos anteriores mostraram, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, que a remoção do baço por esplenectomia resulta em perda da concentração de imunoglobulinas e prejudica a retirada de partículas do sangue (KANG *et al.*, 2004; SIPKA *et al.*, 2006). Isso pode ser comprovado pela gravidade da sepse que atinge mais de 2% de indivíduos esplenectomizados, com maior destaque em crianças, que possuem o sistema imunitário ainda imaturo, e em pessoas imunodeprimidas (RESENDE e PETROIANU, 2002). Os quadros sépticos graves são muito mais comuns em esplenectomizados do que na população em geral, a ponto da sepse estar envolvida no óbito em três quartos dos asplênicos, contra menos de um quarto dos que possuem baço. Alterações no metabolismo das bilirrubinas, de diversos aminoácidos e dos lipídios também são encontradas após a retirada completa do baço (PETROIANU *et al.*, 2008a). O risco de desenvolvimento da infecção fulminante pós esplenectomia ocorre tanto em adultos, quanto em crianças, podendo surgir em qualquer época após a cirurgia e seu risco independe da indicação cirúrgica para a esplenectomia (MARQUES e PETROIANU, 2003). A esplenectomia priva o organismo de um eficiente filtro fagocitário. Sepse e outras complicações infecciosas são conseqüências bem conhecidas da retirada do baço. Com o objetivo de diminuir esses efeitos adversos e preservar as múltiplas funções desse órgão, abordagens conservadoras do baço têm sido cada vez mais utilizadas quando não houver contra-indicação à conservação de tecido esplênico (LIKHTE, 1978; MARQUES *et al.*, 2003). Entretanto, quando a esplenectomia total é inevitável, o autotransplante de baço torna-se a única opção de preservação das funções esplênicas (PETROIANU, 2003b; SOUZA *et al.*, 2005).

De acordo com a literatura, para se manter a viabilidade do baço, é necessário preservar o pedículo vascular esplênico intacto (LIMA e PIMENTA, 1987). Entretanto, estudos prévios, mostraram que o pólo superior do baço apresenta vascularização própria: os vasos esplenogástricos, que não dependem do pedículo esplênico. Desse modo, afecções em que o pedículo esplênico não puder ser preservado, como ocorrem no trauma maior do baço, podem ser tratadas



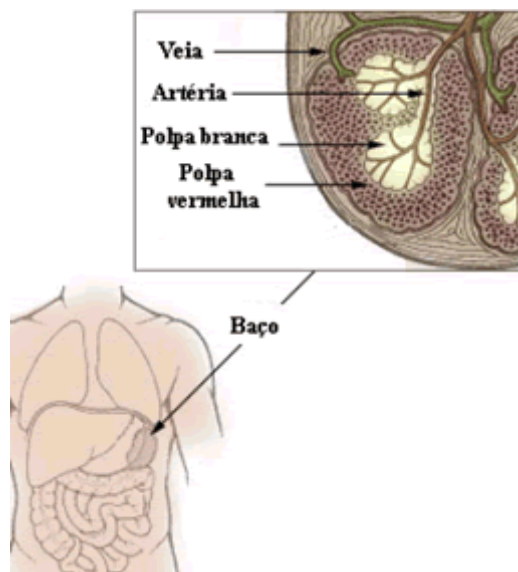
adequadamente mantendo seu pólo superior suprido pelos vasos esplenogástricos (PATEL *et al.*, 1981).

Vários locais de implante têm sido estudados. As porções de baço podem ser implantadas no músculo abdominal, cavidade peritoneal, tecido subcutâneo mesentérico, retroperitônio, mas os melhores resultados foram conseguidos quando o implante foi feito no grande omento (SIPKA *et al.*, 2006; KARAGÜLLE *et al.*, 2007). Silveira e colaboradores (2002) justificaram a opção pelo local de transplante do baço no grande omento, pelo fato de que o autotransplante ao ser irrigado pelas artérias gastroepiplóicas goza de um débito sanguíneo que será pouco inferior ao da artéria esplênica. Além de constituir o melhor local para o autotransplante e por ter uma rica vascularização, o grande omento é ainda muito rico em células inflamatórias, fatores de crescimento e citocinas. A maioria da bibliografia encontrada que analisou a eficácia do autotransplante em humanos escolheu o grande omento como local de preferência para implante dos fragmentos de baço e todos concluíram que havia recuperação das funções esplênicas, valorizando a aplicação desta técnica (LEEMANS *et al.*, 1999; RESENDE e PETROIANU 2002; UPADHYAYA, 2003). Outro aspecto de grande relevância para o sucesso do autotransplante é a quantidade de tecido que deve ser transplantado. Estudos prévios mostraram a necessidade de pelo menos 25% do tecido esplênico normal para se obter a função adequada do baço (MARQUES *et al.*, 2002a)

Muitos trabalhos têm demonstrado que os indivíduos que não possuem baço (asplênicos) são mais susceptíveis a infecções por bactérias encapsuladas que são depuradas por opsonização e fagocitose, demonstrando que essa função é deficiente na ausência do baço (KING e SCHUMACKER, 1954; SANCHEZ, 2001). Nesse contexto, diversos modelos experimentais mostram a efetividade do transplante autógeno de baço na proteção do organismo contra infecções. Marques e colaboradores (2004) verificaram em seu experimento que o auto-implante esplênico, no grande omento, em ratos, adquire a arquitetura macro e microscópica de um baço normal e preserva a função fagocitária bacteriana durante a infecção com *Escherichia coli*. Teixeira e colaboradores (2008) demonstraram que a técnica do autotransplante esplênico é uma estratégia alternativa quando comparado a esplenectomia total mantendo as funções esplênicas durante o combate da infecção causada por *Staphylococcus aureus*. Além disso, indivíduos infectados com o

*Plasmodium* e que sofrem esplenectomia apresentam carga parasitária aumentada no sangue, sugerindo que a função fagocitária do baço é fundamental na malária, visto que o baço é o principal responsável pela remoção dos eritrócitos parasitados da circulação (DEMAR *et al.*, 2004)

O baço desempenha papel fundamental no desenvolvimento da infecção por *L. chagasi*, pois se encontra infectado em todos os casos e durante todo o curso da doença, além de já ter sido demonstrado que é o primeiro órgão a apresentar o parasito, o que sugere uma invasão precoce. Esse órgão está intimamente relacionado às manifestações clínicas da doença, desde a hepatoesplenomegalia até a morte de pacientes quando não tratados (CAMARGO *et al.*, 2006). Além disso, outro aspecto que demonstra a importância do baço na leishmaniose é o fato de ser um órgão linfóide intensamente parasitado, representando um local de nítida interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e a *Leishmania*. Esse cenário torna o baço um interessante órgão para analisar as alterações imunológicas, que levam à disfunção da imunidade celular e à ativação de uma resposta humoral ineficaz, que são de extrema importância na patogênese da leishmaniose visceral (BACELLAR *et al.*, 2005).



**Figura 1:** Localização e estrutura do baço. Fonte: [www.portalsaofrancisco.com.br](http://www.portalsaofrancisco.com.br)

## 1.2 Leishmaniose: agente etiológico

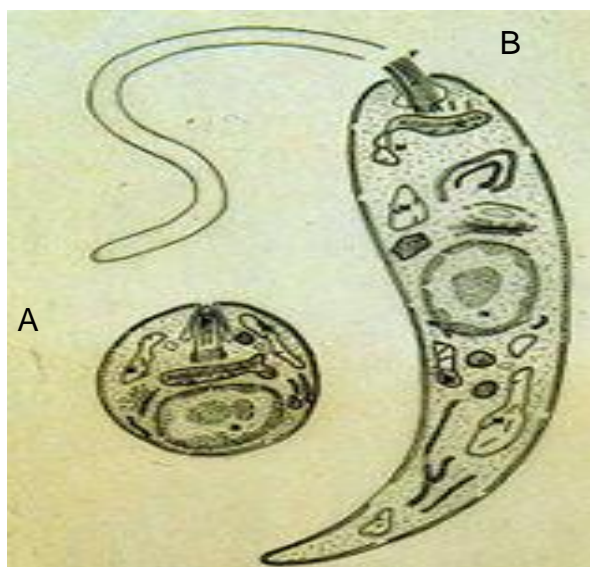
As leishmanioses são enfermidades causadas por protozoários unicelulares flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. São parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema mononuclear fagocítico, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota (Fig. 2 B), encontrada no tubo digestório do inseto vetor, e outra forma denominada amastigota, com um pequeno flagelo não exteriorizado (Fig. 2 A), observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (ALMEIDA *et al.*, 2003; LESSA *et al.*, 2007).

A primeira descrição do parasito das leishmanioses foi feita por Cunningham, na Índia, em 1885 que isolou e descreveu as formas amastigotas de pacientes. Recebeu o nome “kala-azar” que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (SOUZA, 2007). Em 1900, William Leishman ao realizar autópsia num soldado que havia ido a óbito na Índia, identificou no baço, a presença de um protozoário. Entretanto, suas anotações não haviam sido publicadas até 1903, quando Charles Donovan, encontrou o mesmo parasito em outro paciente. Ainda em 1903, William Leishman e Charles Donovan, independentemente, descreveram o parasito, Leishman reconheceu a semelhança do parasito com o agente etiológico da tripanossomíase e identificou-o como responsável etiológico do calazar, enquanto Donovan descreveu o parasito como sendo um esporozoário. Foi então que o médico inglês Ronald Ross (descobridor da etiologia da malária e de seu mecanismo de infecção), demonstrou que os organismos não eram esporozoários e estabeleceu um novo gênero, *Leishmania*, agente causador das leishmanioses prestando homenagem a Leishman, já que a identificação do parasito como protozoário decorreu de seus estudos (BASANO e CAMARGO, 2004; MILES, 2007).

Entre as espécies de *Leishmania*, vinte são potencialmente patogênicas para o homem, e os agentes causadores da leishmaniose visceral (LV) são membros do complexo *donovani*, classificados em quatro espécies: *Leishmania(L) archibaldi*, *Leishmania(L) chagasi*, *Leishmania(L) donovani* e *Leishmania(L) infantum*, distinguidas pelos seus vetores, hospedeiros e patologia provocada (LUKES *et al.*, 2007). Nas Américas, o agente etiológico da leishmaniose visceral americana (LVA) é *L. chagasi*, enquanto que na Europa, Ásia e África, os agentes responsáveis são a *L. infantum* e *L. donovani*. No Brasil, a doença é causada pela *L. chagasi*,

considerada por alguns autores como espécie semelhante a *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia (CAMARGO *et al.*, 2007).

Neste trabalho a espécie utilizada para infecção dos animais foi a *L. chagasi*.



**Figura 2 A e B:** *Leishmania*-forma amastigota (Fig. 2A) encontrada nos macrófagos do hospedeiro e forma promastigota (Fig. 2B) encontrada no tubo digestório do inseto vetor. Fonte: [www.dbbm.fiocruz.br/html/morfologia.htm](http://www.dbbm.fiocruz.br/html/morfologia.htm)

### 1.3 Leishmaniose: vetores e hospedeiros

As espécies de *Leishmania* diferem na virulência, nos sintomas clínicos, na preferência dos insetos vetores e na distribuição geográfica. Entretanto todas têm um ciclo similar, com a forma amastigota no hospedeiro mamífero e a forma promastigota no inseto vetor. Os vetores da LV são insetos pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, cangalhinha entre outros (BRASIL, 2003). Estes insetos vetores vivem em ambientes variados, mas suas formas imaturas se desenvolvem em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa (NEVES, 2005; REY, 2001). *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) é o vetor primário na transmissão da LVA (ARAKI *et al.*, 2009). No Brasil, *Lutzomyia* é o gênero mais estudado devido ao seu papel como vetor na transmissão dos agentes causadores das leishmanioses (REBELO *et al.*, 1996). Mais recentemente,

*Lutzomyia cruzi* foi também referido como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul (GALLATI *et al.*, 1997). No Brasil, a distribuição geográfica de *Lutz. longipalpis* é ampla e parece estar em expansão, visto que estes flebotomíneos estão bem adaptados ao ambiente peridomiciliar, alimentando-se em uma grande variedade de hospedeiros, entre aves, homem e outros animais silvestres e domésticos (DEANE *et al.*, 1962; GRIMALDI *et al.*, 1989). Há indícios de que o período de maior transmissão da LV ocorra durante e logo após a estação chuvosa, quando há um aumento da densidade populacional do inseto (SILVA *et al.*, 2007).

Dentre os hospedeiros vertebrados tem-se animais silvestres (roedores, gambás, tamanduás, tatus, primatas, raposas e preguiças), animais domésticos (cães, gatos e eqüinos) e o homem. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758) é considerado o principal reservatório da LVA. Assim, o cão representa uma fonte de infecção para o vetor, sendo um importante elo na transmissão da doença para o homem (VERÇOSA *et al.*, 2008). O homem também pode ser fonte de infecção, principalmente quando a LV incide sob a forma de epidemia.

Os cães infectados podem ou não desenvolver quadro clínico da doença, cujos sinais são: emagrecimento, eriçamento e queda de pêlos, nódulos ou ulcerações (mais freqüentes nos bordos das orelhas), hemorragias intestinais, paralisia de membros posteriores, ceratite com cegueira e caquexia, podendo evoluir para morte, nos casos mais graves (BRASIL, 2006). O reconhecimento das manifestações clínicas destes reservatórios é importante para adoção de medidas de controle da doença. Os canídeos apresentam intenso parasitismo, o que permite uma fácil infecção do mosquito, e, por este fato, são os mais importantes elos na manutenção da cadeia epidemiológica (MONTEIRO *et al.*, 2005)

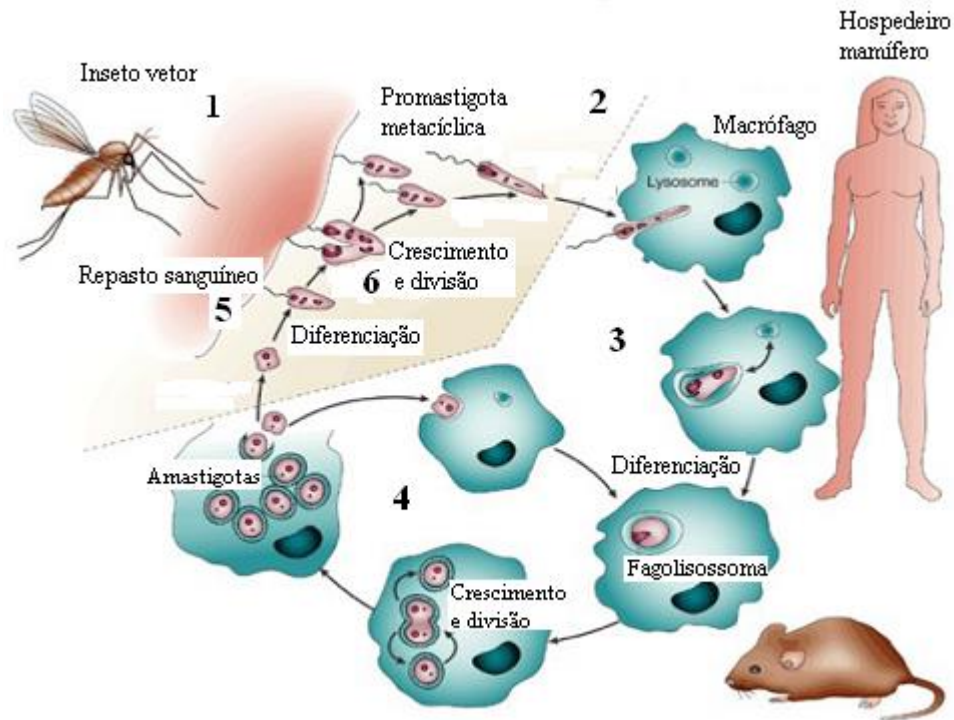
No ambiente silvestre, os reservatórios para a LVA, até então conhecidos, são as raposas (*Cerdocyon thous* e *Dusicyon vetulus*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2003). Já o cão vem sendo apontado como reservatório da doença, e, como hospedeiro doméstico, é, provavelmente, o mais importante reservatório natural relacionado com casos humanos.

#### 1.4 Leishmaniose: ciclo biológico

O ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* spp. envolve alternância entre hospedeiros invertebrados e mamíferos. O modo de infecção é através da picada de insetos transmissores infectados. Somente as fêmeas são hematófagas obrigatórias, pois necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos (ETTINGER e FELDMAN, 1997).

A transmissão da doença para os hospedeiros vertebrados é feita predominantemente por meio da inoculação das formas promastigotas metacíclicas infectantes durante a picada do inseto vetor (*Lutz. longipalpis*). Entretanto, outras possibilidades já foram descritas tais como a via cutânea, placentária e a transfusão sanguínea (REY, 1991).

As fêmeas do inseto vetor picam os animais e o homem para se alimentarem do seu sangue (Fig. 3). Quando uma fêmea encontra um hospedeiro/reservatório infectado com *Leishmania* para se alimentar, ingere também as formas promastigotas que se encontram livres ou no interior dos macrófagos na forma amastigota e permite o desenvolvimento destes para as formas infectantes no seu tubo digestório. Num posterior repasto sanguíneo, os insetos vetores regurgitam os parasitos e infectam outros animais (BRASIL, 2003) (Fig. 2). As promastigotas se transformam novamente em amastigotas. Dentro dos macrófagos, células de defesa do organismo que, neste caso, são incapazes de destruir o parasito, elas se multiplicam por fissão binária (BURCHMORE e BARRET, 2001). Quando o seu número é excessivamente elevado para ficar contido no interior dos macrófagos estes arrebentam e libertam novas amastigotas que vão infectar novas células (REY, 1991). Ocorre assim a disseminação da doença por todo o organismo do animal.



**Figura 3:** Ciclo de vida da *Leishmania* spp. (1) Inoculação das formas promastigotas metacíclicas pelo inseto vetor, (2) fagocitose das formas promastigotas por macrófagos, (3) diferenciação das formas promastigotas em amastigotas nos vacúolos parasitóforos, (4) lise dos macrófagos infectados e liberação das formas amastigotas, (5) ingestão dos macrófagos parasitados pelo inseto durante o repasto sanguíneo, (6) diferenciação de amastigotas em promastigotas procíclicas, multiplicação por divisão binária e migração para o tubo digestório do inseto vetor. Adaptado de SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002.

### 1.5 Leishmaniose visceral: epidemiologia

A LV apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo de forma endêmica em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo, podendo apresentar-se como zoonose, antroponose ou antropozoonose, estas duas últimas, quando o homem atua como reservatório no ciclo de transmissão do parasito (MOLINA *et al.*, 2003). Assim, se tornando um importante problema de saúde pública, devido à sua incidência e alta letalidade, não só nas Américas, mas na Europa, África, Ásia e Oriente Médio (COSTA, 2005).

A LV é uma endemia de grande impacto na saúde pública, caracterizada por elevada taxa de morbidade e letalidade. É uma doença infecto-parasitária cuja característica principal, e que compromete o seu controle, é a diversidade

epidemiológica, em função da grande variabilidade de espécies hospedeiras e reservatórios, de vetores e de características ambientais que interagem e possibilitam a manutenção e difusão da enfermidade (ELKHOURY *et al.*, 2008).

Esta doença afeta pacientes de todas as idades, mas crianças e imunossuprimidos estão mais frequentemente envolvidos devido à inabilidade em conter a infecção (GOMES *et al.*, 2009). Além disso, tem maior prevalência em crianças na faixa etária de zero a nove anos, correspondendo a 80% dos casos detectados, ocorrendo com freqüência em regiões onde a pobreza e desnutrição são comuns (CALDAS *et al.*, 2001). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular muitas vezes agravada pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (MALAFAIA, 2008).

A epidemiologia da LV vem se alterando através do tempo. Até a década de 80, a maioria dos casos concentrava-se nas áreas rurais dos municípios e as crianças de até 15 anos de idade eram mais acometidas. Essa mudança na distribuição da LV parece ser conseqüência de um processo multifatorial (COSTA, 2008). Acredita-se que um dos processos mais relevantes, seja a participação do cão como reservatório doméstico da LV, assim como a adaptação do hospedeiro invertebrado, *Lutz. longipalpis*, ao ambiente peridomiciliar, além do aumento dos casos de co-infecção HIV-*Leishmania* (GARG *et al.*, 2009). Alterações ambientais provocadas pelo homem, a rápida e intensa migração das populações rurais para as periferias urbanas e falta de saneamento básico também contribuíram para a expansão da LV para as áreas urbanas de médio e grande porte (OLIVEIRA *et al.*, 2008a).

A importância da presença de *Lutz. longipalpis* nos ambientes urbanos se faz devido a essa espécie estar bem adaptada e ter um papel importante na epidemiologia da doença, como também sua ampla distribuição ao longo do país (RANGEL e VILELA, 2008). As condições sócio-econômicas, ambientais e hábitos de vida também são fatores significativos na epidemiologia da LV em áreas endêmicas. Casas com cobertura de palha, paredes de taipa e o piso de chão batido, coleta de lixo irregular, ausência de abastecimento de água e sistema de esgotos, contribuem para o desenvolvimento do mosquito transmissor e disseminação da doença (NASCIMENTO *et al.*, 2005). Tais condições podem contribuir para que a LV seja perpetuada nas áreas rurais e periurbanas,



acometendo aglomerados humanos com baixo nível sócio-econômico que vive em condições precárias de moradia (DESJEUX, 2001). Assim, devido ao seu caráter endêmico em várias regiões do mundo, ao processo de expansão de sua área de abrangência e ao crescente número de casos, a LV é considerada pela Organização Mundial da Saúde uma endemia de prioridade absoluta (GONTIJO e MELO, 2004).

As leishmanioses estão presentes em aproximadamente 88 países, com um total de 14 milhões de pessoas infectadas no mundo todo e com 59.000 óbitos registrados anualmente. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco para adquirir a doença, com um registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano, sendo superada apenas pela malária em casos de infecções parasíticas (ALVES, 2009). Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. Nas Américas, a LVA ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que mais de 90% dos casos são registrados no Brasil (GRIMALDI *et al.*, 1989; PANARO *et al.*, 2009).

Recentemente, a LVA apresenta casos autóctones notificados em pelo menos 19 Estados da Federação brasileira, distribuídos em quatro das cinco regiões, permanecendo indene apenas o Sul. Porém, a maior incidência encontra-se na região Nordeste que apresenta 94% de todos os casos de LVA registrados, especialmente nos estados do Piauí, Maranhão, Bahia e Ceará, devido a fatores climáticos favoráveis, temperatura e vegetação (CAMARGO *et al.*, 2007). Isso pode ser comprovado pela baixa precipitação pluvial no Nordeste brasileiro que vem ocorrendo desde 1979, originando a seca em algumas regiões, seca esta que não chega a eliminar o vetor, o flebótomo, pois este resiste à higrometria mínima. No entanto, leva a um incremento da fome, diminui a resistência humana e canina e provoca as correntes migratórias (COSTA *et al.*, 1990). Os movimentos migratórios têm aumentado, e pessoas acompanhadas de animais domésticos, principalmente do cão (os cães acompanham as famílias em suas migrações, sobretudo no Nordeste), dirigem-se para regiões de maior potencial (WERNECK *et al.*, 2008; DESJEUX, 2004).

No Brasil, uma importante mudança no padrão epidemiológico da LVA tem sido verificada. Caracterizada como uma doença rural vem apresentando um processo de urbanização com crescente expansão, principalmente nas regiões sudeste e centro-oeste (NASCIMENTO *et al.*, 2008). A importância da LVA em nosso

país reside na sua alta incidência, na ampla distribuição e no seu potencial de assumir formas graves e letais quando associada aos quadros de desnutrição e infecções concomitantes.

A ampliação da área de distribuição geográfica da AIDS e sua extensão para camadas mais pobres da população e, por outro lado, a crescente urbanização da LV faz supor que a prevalência da co-infecção LVA / HIV venha a aumentar nos próximos anos (RATH *et al.*, 2003). Como infecções oportunistas provocadas pela LV induzem uma resposta inflamatória no hospedeiro, esta co-infecção poderá promover a replicação viral (OLIVIER, *et al.*, 2003). Dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, como também emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vem se tornando uma das doenças mais importantes da atualidade (WHO, 2002)

Em virtude da diversidade epidemiológica, as estratégias de controle dessa endemia ainda são pouco efetivas e estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebótomos eliminação dos reservatórios e atividades de educação em saúde. Ações voltadas para o diagnóstico e tratamento dos casos e atividades educativas devem ser em todas as situações priorizadas, lembrando que as demais medidas de controle devem estar integradas para que possam ser efetivas (FURLAN, 2010; PEDROSA *et al.*, 2004).

## **1.6 Leishmaniose: diagnóstico**

O diagnóstico das leishmanioses tem base nos aspectos epidemiológicos e clínicos, contando com o auxílio de exames laboratoriais e empregando diversos métodos (DIÓGENES *et al.*, 1993). Os métodos conhecidos atualmente para o diagnóstico da leishmaniose são diagnóstico clínico, parasitológico, sorológico, imunológico, molecular e cultivo parasitológico. O diagnóstico laboratorial das leishmanioses pode ser realizado pela demonstração do parasito nos tecidos através de microscopia óptica, detecção do DNA do parasito nas amostras de tecido, imunodiagnóstico pela detecção do antígeno do parasito no tecido ou sangue e pela detecção de anticorpos específicos (PASTORINO *et al.*, 2002; SUNDAR e RAI, 2002). O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral deve ser suspeitado quando o

paciente apresentar: febre e esplenomegalia associada ou não à hepatomegalia, hiperglobulinemia e velocidade de hemossedimentação alta. O diagnóstico confirmatório da LV se baseia na demonstração do parasito nas amostras de tecido ou na cultura de tecido (BARROUIN-MELO *et al.*, 2004).

Análises de aspirados do baço ou de medula óssea oferecem alta eficácia no diagnóstico, mas são procedimentos de risco e invasivos. No entanto, durante a forma oligossintomática, a punção aspirativa de medula óssea pode ou não mostrar a presença da *Leishmania*, não sendo, a princípio, indicada a sua realização (MATHIS e DEPLAZES, 1995). Embora a detecção do parasito nas amostras de sangue por PCR (reação em cadeia da polimerase) apresente alto custo, é considerada uma técnica menos invasiva do que aspiração esplênica e de medula óssea (SALOTRA *et al.*, 2001). Além disso, o método do PCR constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV, pois apresenta 94% de sensibilidade (MARQUES *et al.*, 2006).

A coleta de sangue é realizada para exames sorológicos na pesquisa de anticorpos específicos sendo utilizados principalmente os métodos de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). A necessidade de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade fez surgir, a partir da década de 70, muitos estudos avaliando e aprimorando o ELISA-padrão, assim como, as diversas variações de ELISA. A utilização de antígenos recombinantes ou purificados como as glicoproteínas de membranas gp63, gp72, gp70 e rK39 específicas do gênero *Leishmania*, melhoram a sensibilidade e a especificidade da técnica (DENIAU *et al.*, 2003). Entretanto, reações cruzadas com enfermidades causadas por outros tripanossomatídeos podem ainda ocorrer. A grande vantagem desse teste está na sua simplicidade e baixo custo, quando comparado aos outros. O desempenho dos testes diagnósticos utilizados atualmente é, em muito, limitada pelo antígeno utilizado na técnica. De uma forma geral, são utilizados parasitos totais ou lisados, o que interfere na expressão da especificidade do teste, não alcançando este o valor de 100%. Nos casos de LV, comumente são observados títulos elevados de anticorpos no soro. No entanto, na forma oligossintomática os títulos de anticorpos em geral são baixos e podem permanecer positivos por um longo período (METTLER *et al.*, 2005).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizada a partir da década de 60, demonstra sensibilidade que varia de 90 a 100% e especificidade aproximada de

80% para amostras de soro (DOTA *et al.*, 2009). A especificidade desse teste é prejudicada devido à presença de reações cruzadas com doenças causadas por outros tripanossomatídeos, como o da doença de Chagas e os da leishmaniose tegumentar americana (LTA). A utilização de formas amastigotas de *L. (L.) donovani* como antígeno nas RIFI aumenta significativamente a sensibilidade sem perder a especificidade do teste, resultando numa maior precocidade do diagnóstico frente a animais assintomáticos ou oligossintomáticos (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

O diagnóstico precoce da leishmaniose humana é necessário por se tratar de uma doença que pode ser fatal para o ser humano. Por outro lado, o diagnóstico precoce da doença canina é importante para a adoção de medidas de controle específicas sobre o reservatório doméstico da doença, incluindo o sacrifício do animal infectado (WERNECK *et al.*, 2008).

### **1.7 Leishmaniose: tratamento**

A LV é fatal se não tratada e as formas cutânea/mucocutânea são frequentemente desfigurantes e multiladoras. O tratamento da LV pode variar de acordo com as regiões, mas são limitados a poucas drogas como antimônios pentavalentes, pentamidinas e anfotericina B. No entanto a utilização dessas drogas pode levar ao surgimento de cepas resistentes (MAIA *et al.*, 2009)

Antimônios pentavalentes foram os primeiros medicamentos a serem usados no início do século 20. Estes medicamentos são tóxicos e fracamente tolerados (ARRUDA *et al.*, 2005). Apesar destes fármacos serem usados clinicamente por mais de meio século, seu mecanismo de ação permanece desconhecido. O antimoniato de N-metil glucamina é o fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses e especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. É um produto que requer administração cautelosa, sob acompanhamento clínico e laboratorial, por ser cardiotóxico, hepatotóxico e nefrotóxico (SILVA, 2001). Para ser ativo contra *Leishmania*, o antimônio pentavalente tem que entrar na célula do hospedeiro, atravessar a membrana fagolisossomal e atuar contra amastigotas intracelulares (OUELETTE *et al.*, 2004). A combinação entre antimoniais e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ou alopurinol tem sido

proposta como alternativa para melhora da eficácia terapêutica destes compostos (AMATO *et al.*, 2000).

A pentamidina é considerada como droga de segunda escolha, embora existam poucos trabalhos na literatura avaliando sua aplicação no tratamento. As drogas usadas na segunda linha de tratamento são tóxicas, de baixa tolerância e podem apresentar resistência. A substância é particularmente útil em casos que não responderam aos antimoniais ou para pacientes com leishmaniose que sejam hipersensíveis ao antimônio. A alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o uso (AMATO, 1997).

A anfotericina B, um antibiótico que também pertence ao grupo dos fármacos leishmanicidas de segunda geração é usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais. Em modelos experimentais, a anfotericina B é considerada como uma das drogas com maior atividade leishmanicida (MURRAY, 2001a). Atua inibindo seletivamente a síntese de membrana do parasito formando poros na membrana, levando o parasito a morte (SINGH E SIVAKUMAR, 2004). É efetiva na forma mucosa de leishmaniose, mas muito tóxica e também passível de recidiva. Seu uso é limitado por suas reações adversas, incluindo anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia em um terço dos pacientes. A vantagem do uso da anfotericina B associada à lipossoma (ABL) fundamenta-se no fato dos lipossomas serem fagocitados pelos macrófagos, sítio da infecção intracelular, interagindo diretamente com o ergosterol do parasito e reagindo menos com o colesterol da célula do hospedeiro, aumentando assim a eficácia da droga e sua tolerabilidade (SAMPAIO *et al.*, 1997).

A ABL foi usada com sucesso no calazar resistente a tratamento e também na leishmaniose dérmica pós-calazar (SAMPAIO e MARSDEN, 1997). Embora a formulação lipídica da anfotericina B seja um avanço na terapia contra as leishmanioses, o alto custo prejudica seu uso.

Além dos medicamentos empregados no tratamento da LV, diversas estratégias de vacinação contra a leishmaniose experimental têm sido testadas (MELBY *et al.*, 2001). No entanto, uma vacina efetiva contra a LV humana não está disponível e há poucos trabalhos na literatura com vacinas contra a LV canina e humana (NOAZIN *et al.*, 2008).

## 1.8 Leishmaniose: resposta imunológica

### 1.8.1 Interação inicial e fagocitose

As formas promastigotas infectantes são inoculadas no tecido do hospedeiro vertebrado pelas fêmeas dos insetos vetores durante o repasto sanguíneo. Neste momento os parasitos são internalizados por células fagocitárias, predominantemente macrófagos, embora células dendríticas e neutrófilos também possam ser parasitados. Este processo envolve ligação de moléculas de superfície dos parasitos, entre elas o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 kD (gp63), a receptores expressos na superfície de macrófagos incluindo os receptores 1 e 3 do complemento (CR1 e CR3), receptor manose- fucose, receptor de fibronectina (WILSON e PEARSON, 1988) e receptores Toll-like (TLR) nos fagócitos (CHANDRA *et al.*, 2008; HOU *et al.*, 2008).

O LPG é uma molécula predominante expressa na superfície de todas as promastigotas. Tem um papel muito importante na sobrevivência do parasito e na modulação da resposta imune (COURRET *et al.*, 1999). A gp63 é uma protease expressa na superfície de formas amastigotas e está relacionada à proteção contra ação das enzimas ácidas nos fagolisossomos (DESJARDINS *et al.*, 1997).

Além disso, as moléculas C3b e C3bi atuam, na opsonização do parasito, facilitando a fagocitose por meio de ligação destas moléculas aos receptores do sistema complemento CR3 e CR1 presentes nas células fagocíticas (TAFURI *et al.*, 1996).

### 1.8.2 Imunidade inata e adaptativa na leishmaniose

Vários componentes da resposta imune inata participam do mecanismo de defesa contra os protozoários, mas esses microorganismos escapam dessa defesa (JANEWAY, 2001). Embora a resposta imune adaptativa seja extensivamente estudada em modelos de *Leishmania*, trabalhos avaliando o papel das células da resposta imune inata no controle da leishmaniose têm sido pouco explorados.

Os macrófagos estão envolvidos no início da resposta imune e apresentam ampla distribuição pelo organismo, desempenhando um papel central na imunidade

adquirida (MARTINEZ *et al.*, 2009). Fagocitam partículas estranhas e produzem citocinas e quimiocinas que recrutam outras células inflamatórias para o sítio da infecção. Assim, essas células estão intimamente ligadas à infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, pois são as principais células parasitadas pelas leishmanias, local onde residem e se multiplicam nos vacúolos como amastigota intracelular obrigatória (ENGWERDA e KAYE, 2004).

Tem sido estabelecido que a ativação de macrófagos por citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  leva a produção de intermediários reativos do oxigênio (IRO) e nitrogênio (IRN), os quais são responsáveis pela atividade leishmanicida destas células (COSTA *et al.*, 2007). IRO e IRN são metabólitos tóxicos que causam danos em todas as células vivas que não possuem mecanismos de neutralizar sua atividade.

Segundo Bogdan e colaboradores (2000), a produção de NO pela óxido nítrico sintase induzida tipo 2 (NOS2) é o principal mecanismo utilizado pelos macrófagos murinos para combater a *Leishmania*. A iNOS também desempenha importante papel na destruição inicial do parasito e no recrutamento de fagócitos mononucleares, contribuindo dessa forma para a resolução da infecção (MURRAY *et al.*, 1999). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também é importante para a atividade leishmanicida. Estudos administrando um inibidor do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultaram no aumento da infecção, sugerindo que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta a atividade leishmanicida dos macrófagos (GANTT *et al.*, 2001).

Entretanto, as *Leishmanias* apresentam mecanismos para subverter as funções normais dos macrófagos. Isso inclui inibir a produção de citocinas pelos linfócitos e células NK que levam a ativação de macrófagos, impedindo dessa forma a produção de agentes antimicrobianos como NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Isso capacita o parasito evadir da resposta imune inata e se dividir nos fagolisossomos dos macrófagos, onde distribui e propaga a doença (COSTA *et al.*, 2007).

Os neutrófilos estão envolvidos durante a infecção experimental por *Leishmania*, mas não estão relacionados com a permanência do parasito (CERVIA *et al.*, 1993). Entretanto, McFarlane e colaboradores (2008) demonstraram em seu estudo que camundongos seletivamente depletados de neutrófilos apresentam um aumento significativo da carga parasitária no baço, medula óssea, e em menor extensão no fígado. Isso pode ser comprovado pelo aumento de IL-4 e IL-10 no baço, e secreção reduzida de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+, além

de altos níveis de IgG1 no soro, indicando uma resposta Th2, sugerindo um papel crítico dos neutrófilos na imunidade protetora contra *Leishmania*. Contudo, segundo Rousseau e colaboradores (2001), os neutrófilos contribuem para o controle da *Leishmania* somente na fase inicial atuando como um nicho, para posterior infecção de macrófagos, contribuindo para a inflamação no baço, persistência do parasito e cronicidade da doença. Um dos mecanismos pelo qual os neutrófilos podem controlar a infecção é através da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO) que têm um importante papel na destruição inicial do parasito e no recrutamento de fagócitos mononucleares. Entretanto, ao penetrar no hospedeiro, as *Leishmanias* infectam os macrófagos, livrando-se do ataque dos neutrófilos (ZAMBRANO *et al.*, 2002).

As células natural killer (NK) também participam da resposta imunológica contra a *Leishmania*. São grandes fontes produtoras de IFN- $\gamma$  (KORBEL *et al.*, 2004). Este por sua vez estimula a produção de NO nos macrófagos que é responsável pela destruição do parasito e resistência à infecção (WILSON *et al.*, 2005).

As células dendríticas são APCs profissionais capazes de reconhecer, fagocitar e processar antígenos apresentando-os aos linfócitos T (LT) via moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e moléculas coestimulatórias. Células dendríticas ativadas podem produzir IL-12p70, regulando a proliferação de L Th1, produção de IFN- $\gamma$  contribuindo dessa forma para ativar os macrófagos (BRANDONISIO *et al.*, 2004). São as principais produtoras de IL-12 no início da infecção pela *Leishmania*. Gorak e colaboradores (1998) demonstraram que as células dendríticas localizadas na PALS são as grandes fontes produtoras de IL-12 p40 em camundongos BALB/c durante a LV. Embora desempenhe importante papel na defesa contra microorganismos invasores, a imunidade inata, além de exercer uma função efetora, é fundamental para a ativação de uma resposta imune adaptativa.

A resposta imune adaptativa contra protozoários ocorre após a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas, via MHC classe II para as células T. Como outras células podem ser infectadas, e macrófagos e células dendríticas também expressam moléculas de MHC classe I, nas infecções por protozoários há também ativação das células TCD8<sup>+</sup> (JANEWAY *et al.*, 2002). Os LT CD8<sup>+</sup> tem importante papel tanto pela atividade citotóxica ligada a produção de perforinas e



granzimas, como pela secreção de citocinas e quimiocinas durante a infecção pela *Leishmania* (RUIZ *et al.*, 2007).

Está bem estabelecido que a infecção progressiva em animais BALB/c infectados com *L. major* é promovida pela expansão de L Th2 com produção de IL-4, IL-10 e IL-13. Entretanto, em modelos de infecção com *L. donovani* ou *L. chagasi*, ao contrário de *L. major*, não há uma estrita dicotomia entre Th1 e Th2, onde Th1 se refere à proteção e Th2 a susceptibilidade e exacerbação da doença. Ambos os tipos de respostas estão presentes e este balanço Th1/Th2 parece ser importante no controle da replicação do parasito, progressão da doença ou cura (MIRALLES *et al.*, 1994)

Estudos recentes indicam que a IL-12 tem um papel importante em potencializar a resposta imune celular em infecções por *Leishmania*. A IL-12 é uma citocina heterodimérica composta por duas subunidades  $\square$  p35 e p40 que se associam para formar a molécula p70 que é a forma biológica ativa da IL-12. É produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos B. O papel protetor da IL-12 na LV é atribuído a sua habilidade em ativar macrófagos, aumentando sua atividade microbicida. A IL-12 produzida pelos macrófagos infectados induz a ativação de NK, diferenciação de LTh1 e produção de IFN- $\gamma$  (ALEXANDER e BRYSON, 2005). Engwerda e colaboradores (1998) demonstraram que a neutralização de IL-12 endógena com anticorpos monoclonais resulta na replicação das amastigotas no baço e fígado de camundongos BALB/c e que os animais deficientes em IL-12 apresentam uma carga parasitária significativamente maior que os animais selvagens comprovando seu papel protetor na leishmaniose. Além dos macrófagos, a produção de IL-12p70 pelas células dendríticas é importante para a ativação de LT CD4+ e L TCD8+, visto que a neutralização da IL-12 durante os primeiros dias de infecção resulta no aumento da carga parasitária.

O IFN- $\gamma$  por sua vez, é o principal ativador de macrófagos acentuando sua ação microbicida mediante a estimulação de IRO e IRN. O IFN- $\gamma$  medeia esses efeitos, principalmente ativando a transcrição de genes que codificam as enzimas fagócito-oxidase (NADPH-oxidase) e sintase indutora do óxido nítrico (iNOS sintase), necessárias para a geração de IRO e IRN, respectivamente (WILSON *et al.*, 2005).

Outras citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pode tanto ter efeitos benéficos na resistência do hospedeiro quanto mediar sua patologia

(ENGWERDA *et al.*, 2004). O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por diversas células e apresenta variadas funções. Quando expresso em níveis moderados o TNF- $\alpha$  contribui para a proteção do hospedeiro no fígado com a formação de granulomas (MURRAY *et al.*, 2000a). A expressão de TNF- $\alpha$  é observada nas células de Kupffer tanto na fase inicial quanto na fase final da resposta hepática. Em contraste, o excesso de TNF- $\alpha$  causa danos no hospedeiro desestruturando os tecidos linfóides e contribuindo para a progressão da doença. Além disso, o TNF- $\alpha$  atua na manutenção da estrutura esplênica (SANTANA *et al.*, 2008). O baço de camundongos TNF  $\alpha^{-/-}$  mostram atrofia da polpa branca, perda da segregação de linfócitos B e T, ausência de folículos primários e os MMM são completamente perdidos. Ocorre ainda infiltração de células plasmáticas e macrófagos infectados tanto na polpa branca quanto na polpa vermelha (KAYE *et al.*, 2004).

Já a IL-10 é induzida tanto na infecção experimental quanto na infecção humana por parasitos do gênero *Leishmania*. O bloqueio de IL-10 e de seu receptor na célula alvo levam ao desenvolvimento de uma resposta Th1 com produção de IFN- $\gamma$  e a uma rápida formação de granulomas com morte do parasito, sem provocar danos no tecido (MURRAY *et al.*, 2002).

Os linfócitos T regulatórios (LTregs) que expressam o gene Foxp3 estão presentes durante a LV e contribuem com a secreção de IL-10. Além disso, os LT CD4+Foxp3-CD25- também são fontes produtoras adicionais de IL-10 promovendo a persistência do parasito e estabelecendo a infecção crônica (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Outra subpopulação de linfócitos T CD4+ recentemente descritos é os linfócitos Th17. Esses linfócitos são críticos na imunidade adaptativa e nas doenças autoimunes. Seu desenvolvimento é dependente de citocinas como TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23 além do fator de transcrição ROR $\gamma$ T, levando a produção de IL-17A e IL-17F. A IL-17 produzida por esses linfócitos é importante no controle de diversas infecções, pois promove o recrutamento de monócitos e neutrófilos para o sítio de infecção (MATSUZAKI e UMEMURA, 2007). Segundo Kostka (2006), a produção de IL-23 pelas células dendríticas de camundongos BALB/c infectados com *L. major* são importantes para a produção de IL-17, influenciando na progressão da doença, por regular o recrutamento de neutrófilos.

A resposta imune humoral e o papel dos linfócitos B na LV têm sido pouco estudados. Hipergamaglobulinemia ocorre em humanos e em modelos animais com LV devido a uma ativação policlonal de linfócitos B (BUNN-MORENO *et al.*, 1985; GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1984). No entanto, estes anticorpos não têm efeito protetor evidente na leishmaniose, mas estão envolvidos na patogênese das lesões na LV (MATHIAS *et al.*, 2001). A produção de anticorpos, principalmente IgG, se apresenta elevada quando há infecção crônica. Entretanto, como a ativação do linfócito B é policlonal, a maioria das imunoglobulinas são inespecíficas. Devido a este fato, o organismo não tem capacidade de controlar por mecanismos celulares a infecção. A detecção destes anticorpos é um dado diagnóstico importante para identificar casos de LV em indivíduos com infecção por este parasito (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Estes anticorpos resultam na formação de grande quantidade de imunocomplexos circulantes, podendo levar a deposição dos mesmos nos rins causando glomerulonefrite (SARTORI *et al.*, 1987; ARESU *et al.*, 2007).

Além disso, a detecção de anticorpos IgE específicos para *Leishmania* tem sido correlacionada com a fase ativa da LV (SOUZA *et al.*, 2005). Pacientes com LV apresentam altos níveis de IgG, IgM, IgE e subclasses de IgG específicos para *Leishmania* no soro durante a doença (OZBILGE *et al.*, 2006). Anticorpos específicos contra antígenos do parasito podem ser detectados logo nas fases iniciais da infecção e as concentrações de alguns isótipos e de subclasses de IgG podem ser utilizados como marcadores da evolução clínica e cura (CONRAD *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2006). Tem sido documentada a predominância de isótipos IgG1 durante a doença (ATTA *et al.*, 1998). A análise de subtipos de classes de IgG demonstra que animais infectados, que apresentam um domínio de anticorpos IgG2a no soro e imunidade mediada por células estão associados com infecção assintomática, enquanto, anticorpos IgG1 estão relacionados ao desenvolvimento da doença e um decréscimo no número de linfócitos T e B (BOURDOISEAU *et al.*, 1997).

Segundo Miles e colaboradores (2005), durante a LV ocorre uma elevada produção de anticorpos, e os complexos imunes que se formam, além de estarem envolvidos na patogênese, podem influenciar na produção de citocinas pelas APCs, principalmente macrófagos a produzirem IL-10 prevenindo a erradicação de patógenos intracelulares.

## 1.9 Mecanismos patogênicos nos órgãos envolvidos

A maioria dos estudos tem utilizado camundongos BALB/c como modelo para infecção por *L. chagasi* ou *L. donovani* (ROUSSEAU *et al.*, 2001; McFARLANE *et al.*, 2008). Embora estes camundongos expressem um fenótipo suscetível inicialmente, subsequentemente a doença é controlada pela resposta imune do hospedeiro. Assim, o modelo de infecção em camundongos tem sido comparado aos casos de infecção oligossintomática com progressão para cura (KEMP, 2000). Apesar das várias manifestações clínicas da doença observadas, um ponto comum é o acúmulo de células do sistema mononuclear fagocítico nos órgãos invadidos, levando a uma hiperplasia do sistema reticuloendotelial (SRE), afetando principalmente baço, fígado e a medula óssea (GOTO e LINDOSO, 2004).

No baço, ocorre o crescimento das formas amastigotas levando a hipertrofia e hiperplasia do SRE. A persistência do parasito neste órgão é seguida pela falha em formar granulomas e alteração da microestrutura do tecido esplênico provocando esplenomegalia e aumento da atividade hematopoética. Há atrofia das áreas paracorticais com células plasmáticas numerosas. A ZM, importante sítio de captura de patógenos provenientes da corrente sanguínea e via de entrada dos linfócitos para a polpa branca apresenta perda de seus macrófagos (MALLA e MAHAJAN, 2006). A polpa branca exhibe diminuição da densidade celular linfocitária que decorre da diminuição seletiva de LT com surgimento de plasmócitos e macrófagos. Além disso, ocorre perda dos centros germinativos, com destruição de muitas células dendríticas foliculares. A formação do granuloma é atrasada ou ausente. Se presente, os granulomas se mostram de forma imatura. Essa falha no desenvolvimento de reações granulomatosas e proteção local ainda é uma lacuna a ser entendida (ENGWERDA *et al.*, 2004). O baço então se torna o sítio de infecção crônica, onde a carga parasitária pode ser mantida durante toda a vida do animal.

No fígado, inicialmente ocorre multiplicação das amastigotas nas células de Kupffer, que é geralmente autolimitada devido a uma resposta inflamatória granulomatosa (McELRATH *et al.*, 1988). A diversidade e função desses granulomas têm sido extensivamente estudadas, e muitos dos componentes celulares e moleculares da imunidade adquirida necessária para sua formação, manutenção e função efetoras tem sido caracterizada utilizando camundongos transgênicos ou através da utilização de anticorpos monoclonais. Os granulomas podem se

apresentar de variáveis tamanhos e são constituídos por macrófagos parasitados ou não com formas amastigotas de *L. chagasi*, algumas células epitelióides, pequeno número de linfócitos e plasmócitos e raros neutrófilos (SANTANA *et al.*, 2007).

As formas amastigotas multiplicam rapidamente nas primeiras semanas de infecção, sendo que o pico de multiplicação do parasito coincide com a maior expressão de citocinas IL-4 e IL-10 (MIRALLES *et al.*, 1994). Entretanto, o papel da IL-4 na LV não está bem esclarecido, visto que camundongos deficientes de IL-4 apresentam um maior número de células de Kupffer infectadas e um retardo na maturação dos granulomas (STAGER *et al.*, 2003).

A multiplicação dos parasitos do gênero *Leishmania* ocorre até a quarta semana. Após este período, observa-se um declínio na carga parasitária promovida pela resposta imune adquirida que favorece a destruição eficiente dos parasitos, com uma redução no número de linfócitos TCD4+ e predomínio de linfócitos TCD8+ (WILSON e WEINSTOCK, 1996). Portanto, a resolução da carga parasitária hepática está associada à formação de granulomas que apresentam várias populações de células efectoras e seus mediadores. Desta forma, a morte dos parasitos e o desenvolvimento da imunidade são dependentes da sua formação ao redor das células de kupffer infectadas, o que promove um foco inflamatório, permitindo colaboração efetiva entre os diferentes tipos de células que são requeridas para a morte dos parasitos e a resolução da lesão (MURRAY *et al.*, 1992).

O desenvolvimento do granuloma requer ambos, linfócitos TCD4+ e TCD8+ em associação a monócitos sanguíneos, bem como as citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 sendo a resistência hepática diretamente relacionada a expressão do gene NOS2 e produção de NO. A IL-12 e IFN- $\gamma$  iniciam e dirigem uma resposta Th1 leishmanicida e direciona a formação destes granulomas, nos quais os parasitos são mortos por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ . Entretanto, a eficácia microbicida do granuloma depende de determinantes tanto do hospedeiro quanto do patógeno podendo não necessariamente garantir a função microbicida (MURRAY, 2001b). Contudo, alguns estudos mostram que a citocina TNF- $\alpha$  atua como principal mediador da imunidade no fígado, pois contribui para a maturação eficiente dos granulomas hepáticos (MURRAY *et al.*, 2000a).

A infecção hepática é usualmente autolimitante e a resposta imune no fígado é um bom exemplo de resposta inflamatória granulomatosa com células

mononucleares predominantes, envolvendo células de Kupffer, monócitos, linfócitos T CD4+ e T CD8+. A resistência hepática correlaciona com a produção de IRO e IRN, ambos com importante papel no controle do parasito (MURRAY e NATHAN, 1999).

### **1.10 Mecanismos de evasão**

Um sistema de proteínas ativadas por clivagem em cascata, conhecido como sistema complemento é um dos principais mecanismos extracelulares de combate inicial a agentes externos. Quando a fase promastigota procíclica (estágio no vetor) da *Leishmania* se transforma em forma metacíclica infectiva e penetra no hospedeiro vertebrado, esta sofre alterações na membrana, que são capazes de impedir a inserção do complexo de ataque à membrana C5b-C9 (MAC) do sistema complemento do hospedeiro (OLIVIER *et al.*, 2005)

Esta modificação na membrana ocorre principalmente através do alongamento na estrutura do lipofosfoglicano (LPG), o que dificulta a ligação do complexo MAC do sistema complemento ao parasito. Além disso, durante o desenvolvimento das formas procíclicas, ocorre uma maior expressão das moléculas gp63 (glicoproteína de superfície de 63kDa), que são responsáveis por clivar a molécula C3b em C3bi, sua forma inativa, impedindo, também, a formação do MAC do sistema complemento (ALEXANDER *et al.*, 1999). Após escaparem da ação da lise mediada pelo sistema complemento, as promastigotas de *Leishmania* devem invadir rapidamente a célula-alvo e iniciar a fase intracelular da infecção. Uma vez no interior das células fagocíticas, os parasitos modulam o micro-ambiente, aparentemente hostil, proporcionando facilitar o estabelecimento da infecção (CASTELLANO, 2005). Embora o soro de indivíduos infectados e certos mamíferos contenha fatores capazes de lisar ou aglutinar as promastigotas, ainda dentro dos macrófagos, as amastigotas são protegidas de anticorpos e outras substâncias circulantes que podem ser prejudiciais ao parasito (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998).

O mecanismo de ativação de LT CD4+ e LT CD8+ pelas APCs requer a expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe I ou II e interação de receptores coestimulatórios e seus ligantes (CTLA-4 se

liga a B7-1(CD80) e B7-2(CD81), CD28 se liga a B7-1 e B7-2, CD40-CD40L, MHC de classe II-CD4, MHC de classe I-CD8), processamento de antígenos e apresentação via MHC (MACHADO *et al.*, 2004). No entanto, a *Leishmania* suprime a expressão de MHC II e B7-1 e inibe o processamento e apresentação de antígenos (BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1999; PINELLI *et al.*, 1999). Além disso, a infecção com *L. chagasi*, reduz a expressão de CD54 em monócitos, provocando a desativação de fagócitos mononucleares prejudicando a produção de TNF- $\alpha$  e IL-12. O mecanismo evasivo também inclui redução da expressão de CD11b e CD80 em macrófagos (ALMEIDA *et al.*, 2003a).

Outro mecanismo utilizado pela *Leishmania* é através do aumento da expressão de CTLA-4, um inibidor expresso na superfície dos LT ativados (GOMES *et al.*, 2000). Murphy e colaboradores (1998) demonstraram que o bloqueio de CTLA-4 em camundongos aumenta a resistência do hospedeiro contra patógenos intracelulares como a *Leishmania*, sendo um forte potencial terapêutico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar o efeito da esplenectomia e do implante autógeno de baço na carga parasitária, produção de IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-17, e na resposta inflamatória de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar a carga parasitária através da técnica de diluição limitante, em macerados de baço e fígado, 30 dias após a infecção intraperitoneal com *L. chagasi* em camundongos BALB/c.
- Dosar a produção de IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-17 no sobrenadante dos macerados de baço e fígado, trinta dias após a infecção com *L. chagasi*.
- Analisar a histologia do tecido hepático de animais infectados com *L. chagasi* avaliando a morfologia geral dos órgãos e o acúmulo de células mononucleares inflamatórias.



### 3 MATERIAL e MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, machos, de 8-10 semanas de idade foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF) e mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFJF) em gaiolas microisoladoras em estantes ventiladas (Alesco), tendo como forma de alimentação exclusivamente ração comum e água *ad libitum*. Para a realização da técnica foram utilizados seis camundongos por grupo, assim distribuídos: grupo operação simulada (CT), grupo esplenectomia total (SP), grupo omento maior (AT) - implante autógeno de baço no omento maior. O experimento foi repetido três vezes, totalizando 54 camundongos.

Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (Protocolo nº 035/2009).

#### 3.2 Procedimento cirúrgico

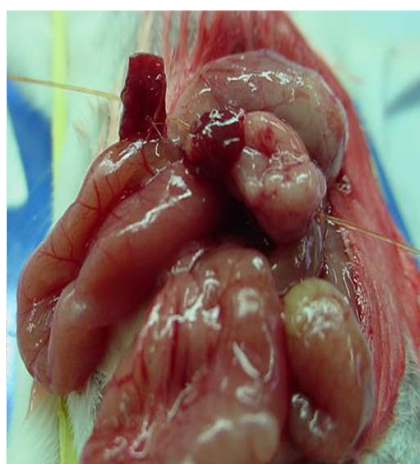
Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução anestésica composta pelas seguintes substâncias: quetamina (5%), xilazina (2%) e solução salina (0,9%), na proporção de 3:1:8, na dose de 0,005 ml/g de peso corporal. A intervenção cirúrgica foi realizada na capela de fluxo laminar e utilizou material previamente esterilizado. Nos animais do grupo operação simulada (CT) realizou-se laparotomia mediana, inventário da cavidade abdominal, mobilização do baço, isolamento dos vasos esplênicos e laparorráfia (Fig. 4). No grupo esplenectomizado (SP) realizou-se laparotomia mediana, esplenectomia total convencional, ligadura do pedículo vascular e dos vasos curtos esplênicos com categute simples 5-0 (Fig. 5). No grupo com implante autógeno (AT), 30% do tecido esplênico ressecado foi individualizado, pesado e dividido em duas partes, conforme a técnica já descrita por Nunes *et al.* e os fragmentos colocados em um envelope no omento maior (Fig. 6).



**Figura 4:** Técnica cirúrgica- Abertura da cavidade peritoneal para simular o trauma cirúrgico (grupo CT).



**Figura 5:** Técnica cirúrgica- Abertura da cavidade peritoneal e retirada do baço (grupo SP)



**Figura 6:** Técnica cirúrgica- Abertura da cavidade peritoneal e transplante autógeno de baço no grande omento (AT).

### 3.3 Parasitos e infecção

*Leishmania chagasi* (UB104) gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia foi cultivada em meio BHI (Brain Heart Infusion) líquido enriquecido com 1% de L- glutamina, 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) a 25°C. Os parasitos na fase estacionária foram centrifugados a 2000 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos, lavados com solução salina tamponada com fosfatos (PBS a 0,15 M, pH 7,2) e ressuspensos em PBS. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer e ajustada para a concentração de 10<sup>6</sup> parasitos em 50 µL de PBS. Todos os animais foram infectados via intraperitoneal (i.p) com 10<sup>6</sup> formas promastigotas de *L. chagasi* após trinta dias da cirurgia.

### 3.4 Avaliação da carga parasitária

O número de parasitos no baço e fígado foi quantificado após trinta dias da infecção pela técnica da diluição limitante. Os órgãos foram coletados na capela de fluxo laminar, pesados e homogeneizados individualmente em 2 mL de meio BHI líquido enriquecido com 1% de L- glutamina, 10% de SFB, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) a 25°C. As suspensões do homogeneizado dos órgãos foram diluídas na proporção 1:10 (10µL de suspensão em 90µL de meio BHI líquido enriquecido) seguida de 6 diluições seriadas na base 10, em microplacas de 96 poços. As placas foram incubadas durante 14 dias a uma temperatura aproximada de 25°C e após esse período foi realizada a contagem das promastigotas de *L. chagasi* em câmara de Neubauer.

### 3.5 Análise da produção de citocinas

Os órgãos foram macerados (100mg/mL) em solução de extração de citocinas (2,34% de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de albumina bovina sérica, 0,0017% de fluoreto de fenilmetanosulfonil, 0,0048% de cloreto de benzetônio, 0,0372% de etilenodiaminatetraacetato dissódico e 0,002% de aprotinina) e centrifugados a

10000 rpm a 4°C. Os sobrenadantes obtidos dos macerados de baço e fígado dos camundongos foram coletados e submetidos à técnica de ELISA (ensaio imunoenzimático) de captura para as citocinas IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17 e TNF- $\alpha$  (BD OptEIA, CA, USA). Placas de ELISA foram sensibilizadas com 50  $\mu$ L/poço de anticorpo de captura, previamente diluído (1:250) em tampão carbonato (IFN- $\gamma$ ) ou tampão fosfato (IL-12, IL-10, IL-17 e TNF- $\alpha$ ) e incubadas por 18 horas a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS Tween-20 (PBST) e os sítios inespecíficos bloqueados com 100 $\mu$ L/poço de PBS contendo 10% SFB, permanecendo incubadas por 1 hora. Após o período de incubação as placas foram lavadas três vezes com PBST e em seguida foram colocadas as amostras e os padrões de citocinas para construção das curvas-padrão (diluição seriada 1:2 em PBS contendo 10% SFB). As placas com as amostras e os padrões foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e posteriormente lavadas três vezes (PBST). Em seguida, o segundo anticorpo anti-citocina biotilado foi adicionado juntamente com estreptavidina-peroxidase e as placas incubadas por mais 1 hora a temperatura ambiente. Mais quatro lavagens foram realizadas e a reação revelada pela adição do substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N e a leitura feita em leitor de ELISA (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) a 450nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes (IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17 e TNF- $\alpha$  –BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA).

### **3.6 Histologia convencional**

Para avaliação histopatológica, fragmentos de fígado dos animais estudados foram fixados em solução de formol tamponado 10% por 24 horas. Após os procedimentos rotineiros para inclusão em parafina, foram realizados cortes de aproximadamente 5 $\mu$ m de espessura, semi-seriados, corados pela hematoxilina e eosina (HE). O material foi avaliado pelo patologista que analisou o padrão histológico do baço, implantes esplênicos e fígado em microscópio óptico e posteriormente as fotografou.

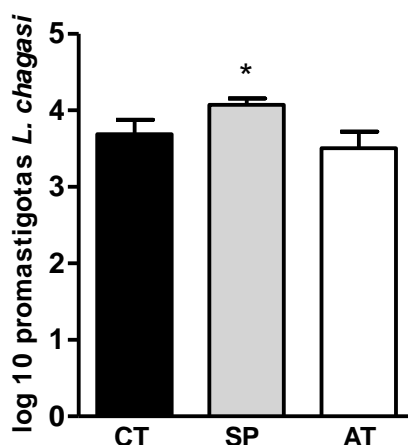
### **3.7 Análise estatística**

As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para determinação das diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Para tal, utilizou-se o programa GraphPad Prism ®5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estimativa de parasitos viáveis no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

Através da técnica de diluição limitante, o parasitismo local foi avaliado 30 dias após a infecção com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi* nos macerados de fígado dos animais do grupo controle (CT), grupo esplenectomizado (SP) e grupo autotransplantado em grande omento (AT). Os resultados mostram que os animais submetidos à esplenectomia total apresentaram carga parasitária significativamente maior no fígado quando comparados aos grupos CT e AT que por sua vez não diferiram entre si (Fig. 7).

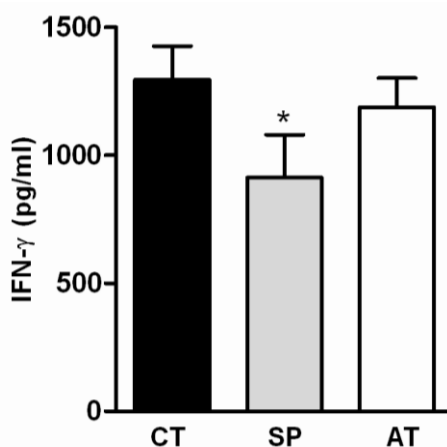


**Figura 7. Estimativa da carga parasitária nos macerados de fígado de animais BALB/c infectados com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi*.** A contagem dos parasitos foi feita pelo método da diluição limitante. Resultados são as médias  $\pm$  desvio padrão expressos em log. CT (grupo controle), SP (grupo esplenectomizado) e AT (grupo esplenectomizado e autotransplantado em grande omento). \*( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa entre SP versus CT e AT.

Os camundongos infectados mostraram números detectáveis de parasitos em todos os órgãos avaliados sendo que os animais esplenectomizados tiveram carga parasitária maior no fígado, quando comparada aos demais grupos.

#### 4.2 Quantificação da produção de IFN- $\gamma$ no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

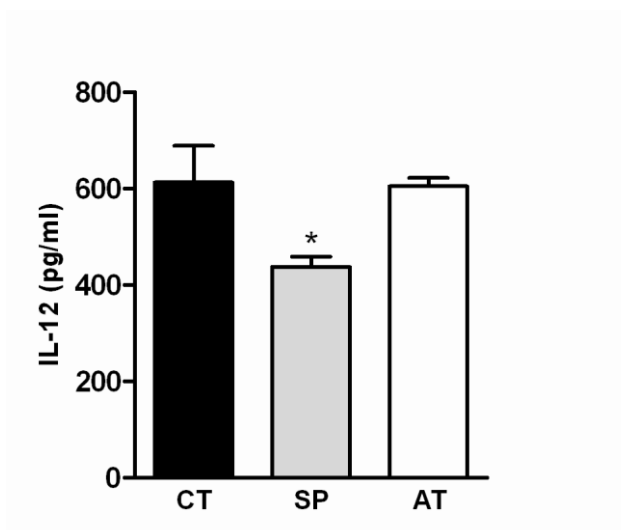
A produção de IFN- $\gamma$  foi avaliada nos sobrenadantes dos macerados de fígado dos animais, 30 dias após a infecção com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi*. Nos sobrenadantes dos macerados dos animais do grupo SP foram encontradas menores quantidades de IFN- $\gamma$  ( $912.7 \pm 68.34$  pg/mL) em relação ao grupo CT ( $1296 \pm 53.37$  pg/mL) e AT ( $1189 \pm 46.30$  pg/mL) (Fig. 8). Entretanto não houve diferenças significativas entre os grupos CT e AT.



**Figura 8. Quantificação de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com *L. chagasi*.** Os animais foram infectados i.p com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi* 30 dias após a cirurgia. Os níveis de IFN- $\gamma$  foram avaliados pelo método de ELISA. Resultados expressam as médias  $\pm$  desvio padrão, expressos em pg ml<sup>-1</sup>. CT (grupo controle), SP (grupo esplenectomizado) e AT (grupo esplenectomizado e autotransplantado em grande omento). \*(p<0,05) indica diferença significativa entre SP versus CT e AT.

### 4.3 Quantificação da produção de IL-12 no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

A produção de IL-12 foi avaliada nos sobrenadantes dos macerados de fígado, 30 dias após a infecção com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi*. Os animais do grupo SP produziram no fígado quantidades significativamente menores de IL-12 ( $437.4 \pm 21.24$  pg/mL) em relação aos grupos CT ( $613.1 \pm 75.87$  pg/mL) e AT ( $605.1 \pm 16.90$  pg/mL). Entretanto, não houve diferença significativa entre os animais do grupo CT e grupo AT (Fig. 9).

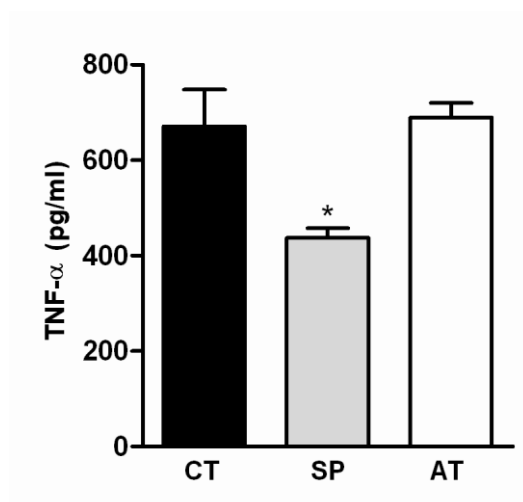


**Figura 9. Quantificação de IL-12 em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com *L. chagasi*.** Os animais foram infectados i.p com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi* 30 dias após a cirurgia. Os níveis de IL-12 foram avaliados pelo método de ELISA. Resultados expressam as médias  $\pm$  desvio padrão, expressos em pg ml<sup>-1</sup>. CT (grupo controle), SP (grupo esplenectomizado) e AT (grupo esplenectomizado e autotransplantado em grande omento). \*( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa entre SP versus CT e AT.



#### 4.4 Quantificação da produção de TNF- $\alpha$ no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

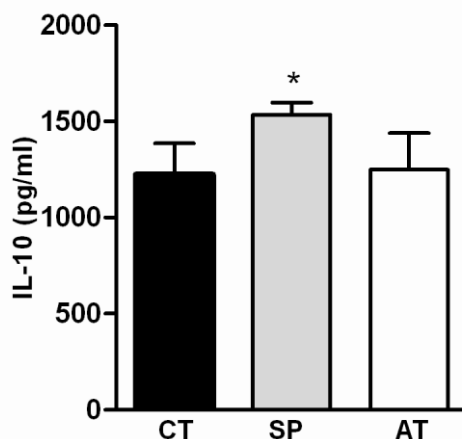
A produção de TNF- $\alpha$  foi avaliada nos sobrenadantes dos macerados de fígado, 30 dias após a infecção com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi*. Os animais SP produziram no fígado quantidades significativamente menores de TNF- $\alpha$  ( $437.8 \pm 19.92$  pg/mL) em relação aos grupos CT ( $670.8 \pm 77.60$  pg/mL) e AT ( $689.5 \pm 31.11$  pg/mL). Não houve diferença significativa entre os animais dos grupos CT e AT (Fig. 10) quanto à produção de TNF- $\alpha$ .



**Figura 10. Quantificação de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com *L. chagasi*.** Os animais foram infectados i.p com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi* 30 dias após a cirurgia. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram avaliados pelo método de ELISA. Resultados expressam as médias  $\pm$  desvio padrão, expressos em pg ml<sup>-1</sup>. CT (grupo controle), SP (grupo esplenectomizado) e AT (grupo esplenectomizado e autotransplantado em grande omento). \*(p<0,05) indica diferença significativa entre SP versus CT e AT.

#### 4.5 Quantificação da produção de IL-10 no macerado de fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

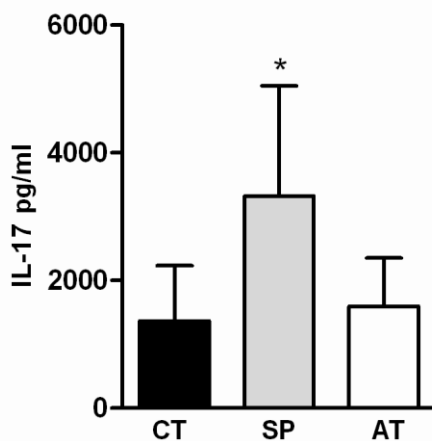
A produção de IL-10 foi avaliada nos sobrenadantes dos macerados de fígado, 30 dias após a infecção com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi*. Os animais esplenectomizados produziram no fígado quantidades significativamente maiores de IL-10 ( $1533 \pm 23.96$  pg/mL) em relação aos animais dos grupos CT ( $1224 \pm 61.47$  pg/mL) e AT ( $1249 \pm 67.14$  pg/mL), que por sua vez, não diferiram entre si (Fig. 11).



**Figura 11. Quantificação de IL-10 em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com *L. chagasi*.** Os animais foram infectados i.p com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi* 30 dias após a cirurgia. Os níveis de IL-10 foram avaliados pelo método de ELISA. Resultados expressam as médias  $\pm$  desvio padrão, expressos em pg ml<sup>-1</sup>. CT (grupo controle), SP (grupo esplenectomizado) e AT (grupo esplenectomizado e autotransplantado em grande omento). \*(p<0,05) indica diferença significativa entre SP versus CT e AT.

#### 4.6 Quantificação da produção de IL-17 no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

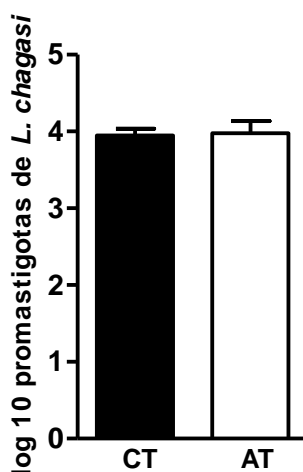
A produção de IL-17 foi avaliada no sobrenadante do macerado de fígado 30 dias após a infecção com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi*. Não houve diferença significativa entre os grupos CT ( $1368 \pm 385.8$  pg/mL) e AT ( $1595 \pm 378.4$  pg/mL) quanto à produção de IL-17. Contudo, os animais esplenectomizados produziram quantidades significativamente maiores de IL-17 ( $3321 \pm 862.8$  pg/mL) em relação aos grupos CT e AT (Fig. 12).



**Figura 12. Quantificação de IL-17 em sobrenadantes de macerados de fígado de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com *L. chagasi*.** Os animais foram infectados i.p com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi* 30 dias após a cirurgia. Os níveis de IL-17 foram avaliados pelo método de ELISA. Resultados expressam as médias  $\pm$  desvio padrão, expressos em pg ml<sup>-1</sup>. CT (grupo controle), SP (grupo esplenectomizado) e AT (grupo esplenectomizado e autotransplantado em grande omento). \*(p<0,05) indica diferença significativa entre SP versus CT e AT.

#### 4.7 Estimativa de parasitos viáveis no baço de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

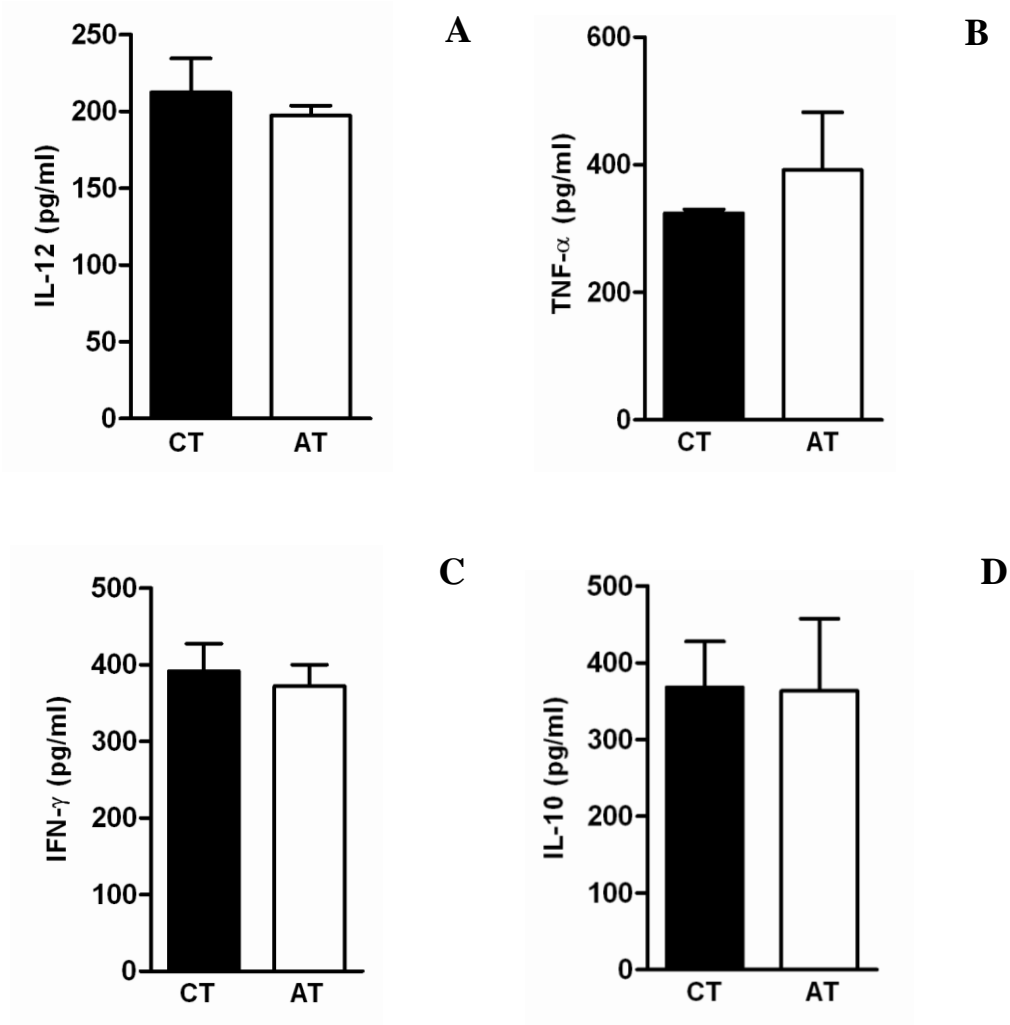
O parasitismo foi avaliado nos macerados de baço dos animais do grupo controle (CT) e no fragmento esplênico dos animais do grupo autotransplantado em grande omento (AT) através da técnica de diluição limitante, 30 dias após a infecção. Os animais foram infectados com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi*. O gráfico abaixo mostra que não houve diferenças significativas na contagem dos parasitos entre o grupo com baço íntegro ou que foram submetidos ao implante autógeno esplênico (Fig. 13).



**Figura 13. Estimativa da carga parasitária nos macerados de baço e em fragmentos esplênicos transplantados.** Camundongos BALB/c foram infectados com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi* 30 dias após a cirurgia. A contagem dos parasitos foi feita pelo método da diluição limitante. CT (grupo controle) e AT (grupo esplenectomizado e autotransplantado em grande omento). Resultados são as médias  $\pm$  desvio padrão expressos em log.

#### 4.8 Quantificação da produção de citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-10) no baço de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

A produção de citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 foi avaliada nos sobrenadantes dos macerados de baço, 30 dias após a infecção com *L. chagasi*. Os resultados abaixo mostram que os animais do grupo CT têm níveis semelhantes de IL-12 (Fig. 14A), TNF- $\alpha$  (Fig. 14B), IFN- $\gamma$  (Fig. 14C) e IL-10 (Fig. 14D) quando comparados ao grupo AT.



**Figura 14.** Quantificação de IL-12 (Fig. A), TNF- $\alpha$  (Fig. B), IFN- $\gamma$  (Fig. C) e IL-10 (Fig. D) em sobrenadantes de macerados de baço (CT) e fragmentos esplênicos transplantados (AT) de animais BALB/c, após 30 dias de infecção com *L. chagasi*. Os animais foram infectados i.p. com  $10^6$  promastigotas de *L. chagasi* 30 dias após a cirurgia. A produção de citocinas foi avaliada pelo método de ELISA. CT (grupo controle) e AT (grupo esplenectomizado e autotransplantado em grande omento). Resultados expressam as médias  $\pm$  desvio padrão, expressos em  $\text{pg ml}^{-1}$ .

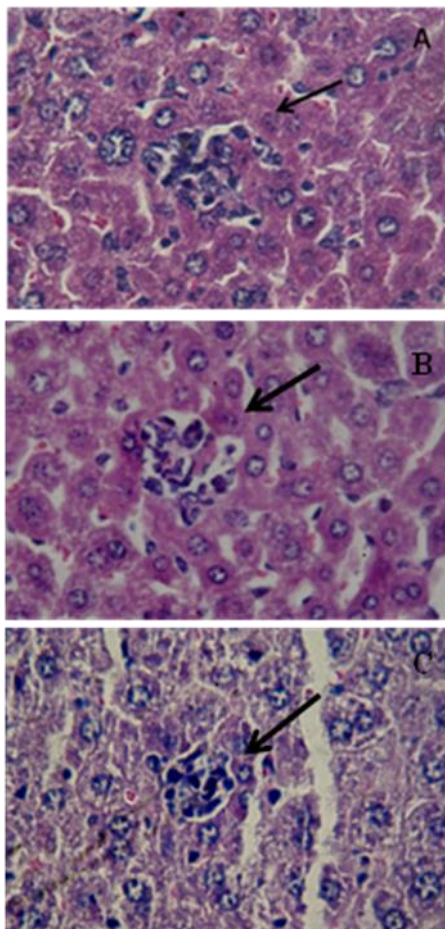
#### 4.9 Análise histológica do tecido hepático de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*.

A análise histológica do fígado dos animais infectados com *L. chagasi* revelou no grupo esplenectomizado (Fig. 15C) poucos acúmulos de infiltrados celulares comparado aos animais que possuem o baço intacto, que apresentou acúmulo um pouco maior de células inflamatórias no fígado (Fig. 15 A). Nos animais do grupo autotransplantado foi também verificada a presença de poucos infiltrados celulares (Fig. 15B). Todo o material foi analisado por um mesmo observador e os campos escolhidos de forma aleatória. Foram considerados os seguintes itens de avaliação: (1) a estrutura geral do órgão, (2) morfologia dos hepatócitos, (3) presença de acúmulo de células mononucleares intraparenquimatosas.

**Tabela 1:** Número de áreas de infiltrados de células mononucleares no fígado de camundongos após 30 dias de infecção.

Grupo	Áreas de infiltrados de células mononucleares <sup>a</sup>	
	30 dias	(n) <sup>b</sup>
Controle (CT)	++ <sup>d</sup>	6
Esplenectomizado (SP)	+ <sup>e</sup>	6
Autotransplantado (AT)	+ <sup>e</sup>	6

<sup>a</sup> Média do número de áreas de infiltrados com células mononucleares em 80 campos analisados ao microscópio óptico. <sup>b</sup> Número de camundongos estudados. <sup>c</sup> moderado (++) e <sup>d</sup> discreto (+).



**Figura 15: Fotomicrografia de tecido hepático de camundongos infectados com *L. chagasi*.** Presença de infiltrado inflamatório com acúmulo intraparenquimatoso de células mononucleares no fígado (setas), em animal do grupo controle (A), em camundongo do grupo esplenectomizado (B), e em camundongo do grupo esplenectomizado e autotransplantado (C). (400x).

## 5 DISCUSSÃO

A importância incontestável do baço na resposta imunológica e a descoberta de outras atribuições desse órgão trouxeram uma nova orientação no tratamento das afecções esplênicas (ALBERTI *et al.*, 2008). Tanto a indicação quanto a abordagem cirúrgica tornaram-se cada vez mais conservadoras (CHRISTO, 2005).

Técnicas como a conservação do pólo superior do baço foram descritas. O pólo superior do baço, suprido apenas pelos vasos esplenogástricos, tem capacidade de remover da circulação bactérias vivas, mostrando que, mesmo sem a vascularização pelo pedículo esplênico, há uma eficiente depuração sangüínea (SILVA *et al.*, 2003). E, em pacientes onde a esplenectomia total é inevitável, o transplante autógeno de baço se torna uma alternativa para a preservação das funções esplênicas (NUNES *et al.*, 2005).

A esplenectomia, em qualquer idade e por qualquer indicação, aumenta o risco de morte por infecção fulminante (PETROIANU, 2007; MARQUEZ, 2001). Contudo, indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) tendem a apresentar melhora do quadro clínico após a remoção do baço, possivelmente devido à eliminação da grande carga viral existente nos linfócitos esplênicos (BERNARD *et al.*, 1998; SUMARAJU *et al.*, 2001).

Na literatura existem poucos trabalhos avaliando o papel do baço durante infecções causadas por protozoários. Embora vários estudos demonstrem o papel protetor do baço durante infecções provocadas por bactérias, Kuranaga e colaboradores (2005) demonstraram que a esplenectomia reduz o crescimento de *Listeria monocytogenes* após infecção endovenosa. Perobelli e colaboradores (2008), também demonstraram o controle desta bactéria nos animais esplenectomizados, enquanto que os animais esplenectomizados infectados com *Escherichia coli* demonstraram maior susceptibilidade. No entanto, esta susceptibilidade foi revertida pelo transplante autógeno de baço que manteve as funções do órgão independente do sítio de implante ter sido retroperitônio ou grande omento.

Neste trabalho, foi avaliado o efeito da remoção do baço em camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi* através da carga parasitária,



produção de citocinas e análise histopatológica. Foi demonstrado que animais que possuem o baço íntegro ou submetidos ao implante esplênico autógeno foram mais resistentes a infecção com *L. chagasi* comparados aos animais esplenectomizados. Isso sugere um importante papel protetor do baço durante a LV. Os dados obtidos mostram que os animais infectados com *L. chagasi* e submetidos à esplenectomia apresentaram uma carga parasitária maior no fígado comparados aos animais que possuem o baço íntegro, sugerindo que na ausência do baço as amastigotas migram para o fígado já que as mesmas têm um tropismo por este órgão. Estes resultados sugerem que a esplenectomia pode influenciar na resposta imunológica durante a LV.

Entretanto, Maioli e colaboradores (2007) demonstraram que a esplenectomia não altera o perfil de citocinas e nem mesmo a carga parasitária dos animais infectados com *L. major*, patógeno causador da leishmaniose cutânea, mas sugere a importância do baço na resposta imune protetora contra a LV.

Em LV não está claro o modelo de resposta Th1/Th2 como proteção e susceptibilidade respectivamente. Estudos têm encontrado diferenças entre esses modelos e aqueles de leishmaniose cutânea (GOTO e PRIANTI, 2009).

Sabe-se que durante a infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, as células do sistema mononuclear fagocítico parasitadas atuam como APCs, as quais ativam L TCD4+ Th1 ou Th2. Se ativados, os linfócitos Th1 produzem citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, citocinas próinflamatórias que aumentam a atividade fagocítica das células e a citotoxicidade dos linfócitos. Os macrófagos ativados por sua vez, produzem IRO e IRN, substâncias tóxicas para o parasito levando ao controle e eliminação da infecção (HOLZMULLER *et al.*, 2006). No entanto, os linfócitos Th2 produzem citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-10 e ativam os linfócitos B desencadeando a produção de anticorpos (ALEXANDER E BRYSON, 2005; IKEDA *et al.*, 2007). A produção intensa de anticorpos leva ao acúmulo de imunocomplexos nas paredes dos vasos sanguíneos, podendo ser, portanto, prejudicial e não protetora para o hospedeiro (IKEDA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2000).

A imunidade efetiva para *Leishmania sp.* é mediada por células e resulta na morte do parasito por macrófagos ativados. No entanto, na LV há forte depressão da imunidade celular, baixa produção de citocinas próinflamatórias,

como IFN- $\gamma$  e IL-2 e, por outro lado, aumento da produção das citocinas IL-4 e IL-5, ativação policlonal de células B e hipergamaglobulinemia (HOLADAY *et al.*, 1993).

Embora vários fatores possam contribuir para a ausência da resposta imune celular na LV, as evidências de que existe nesta doença ativação de células Th2 e de células regulatórias da resposta imune indicam a importância de avaliar o papel de citocinas com atividade imunomoduladora na patogenia da leishmaniose visceral.

Neste trabalho foi possível observar que os animais submetidos à esplenectomia apresentaram níveis elevados de IL-10 no fígado, coincidindo com o aumento da carga parasitária. A IL-10 é uma citocina que modula tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa exercendo sua atividade antiinflamatória tanto na leishmaniose experimental quanto em humanos (NYLÉN *et al.*, 2007). Esta citocina suprime muitas funções de células NK e de células T por inibir a apresentação de antígenos e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- $\gamma$  (KANE e MOSSER, 2001). A IL-10 foi descrita como uma citocina de células Th2, mas hoje se sabe que outros tipos celulares também podem produzir como monócitos/macrófagos, LB, tímócitos e queratinócitos.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a infecção com *L. donovani* induz a secreção de IL-10 e atenua a geração de superóxido, óxido nítrico e TNF- $\alpha$ , facilitando a sobrevivência deste parasito, situação esta que é revertida quando se faz tratamento com anticorpos anti-IL-10 (BHATTACHARYYA *et al.*, 2001). A IL-10 bloqueia a ativação de uma resposta Th1 e conseqüentemente uma resposta citotóxica por diminuir a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , inibindo dessa forma a ativação de macrófagos e a habilidade destas células em eliminar a *Leishmania* (RIBEIRO *et al.*, 1998).

O tratamento de camundongos com anticorpos anti-IL-10 durante a leishmaniose visceral experimental estimula a produção de citocinas Th1 e aumenta a produção de NO concomitantemente com a expressão de iNOS reduzindo a carga parasitária no baço e fígado (BHATTACHARJEE *et al.*, 2009).

Entretanto, durante muitas infecções, LT CD4 produzem ambos IFN- $\gamma$  para estimular linfócitos Th1 e IL-10. Novos dados mostram que a IL-10 produzida pelas células efetoras Th1 limitam os danos causados pela inflamação exagerada. Mas, esse controle pode também limitar a efetividade da resposta imune resultado na falha em eliminar o patógeno (TRINCHIERI, 2007; LEAVY *et al.*, 2007).

Neste trabalho sugerimos que o aumento da carga parasitária no fígado dos animais esplenectomizados e infectados seja em parte, consequência do aumento da produção de IL-10, já que esta citocina atua como supressora de uma resposta Th1 protetora durante a LV. Além dos monócitos/macrófagos, LB, tímócitos, queratinócitos e Tregs produzirem IL-10, outros tipos celulares como L TCD4+CD25-Foxp3- também são capazes de induzir a produção de IL-10 contribuindo dessa forma para o estabelecimento da infecção (RODRIGUES *et al.*, 2009).

No presente trabalho, além da redução na produção de IFN- $\gamma$ , citocinas proinflamatórias como IL-12 e TNF- $\alpha$  também tiveram seus níveis reduzidos nos animais esplenectomizados. A IL-12 tem sido apontada como um dos mais importantes componentes da fase inicial da infecção pela *Leishmania* (TAYLOR e MURRAY, 1997). A IL-12 é produzida primariamente por células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) e sua principal atividade biológica é sobre células T e células NK, nas quais ela estimula a produção de citocinas, principalmente IFN- $\gamma$ , proliferação celular e citotoxicidade. A IL-12 desempenha um papel importante na diferenciação e expansão de células T CD4+ do tipo Th1 e é importante para o padrão de resistência do camundongo (MURRAY *et al.*, 2000b).

Bacelar e colaboradores (2000) demonstraram que IL-12 é fundamental para a manutenção de uma resposta imune Th1 em indivíduos curados e que IL-10 é a principal citocina que pode desregular uma resposta imune, sendo, portanto as principais citocinas reguladoras durante a LV.

Já no trabalho de Magalhães e colaboradores (2006), foi demonstrada a elevação simultânea de níveis plasmáticos e intracitoplasmáticos de IFN- $\gamma$  e IL-10 em indivíduos com LV ativa. Kemp e colaboradores (1999) demonstraram existir uma população de linfócitos T produtores tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-10,

além dos subtipos convencionais Th1 e Th2. Estes linfócitos são gerados na presença de IL-12, enquanto anticorpos neutralizantes anti-IL-12 impede a geração de IFN- $\gamma$  e IL-10.

Embora o baço seja o sítio de infecção crônica durante a LV, ele é um importante órgão produtor de IFN- $\gamma$  e nós observamos que a esplenectomia reduz os níveis de IFN- $\gamma$  no fígado dos animais infectados com *Leishmania chagasi*. Isso sugere, portanto, que a esplenectomia pode influenciar na produção de IFN- $\gamma$  pelo fígado, alterando a resposta imunológica contra a *Leishmania*, e o controle da doença.

Os animais submetidos à esplenectomia apresentaram quantidades menores de IFN- $\gamma$  no sobrenadante do macerado do fígado e maior parasitemia. Sabe-se que esta citocina limita o crescimento de *Leishmania sp.* em macrófagos murinos e humanos, limitando assim a progressão da doença (MURRAY *et al.*, 1992). No entanto, os animais com baço intacto e os animais submetidos ao implante autógeno de baço em grande omento tiveram níveis semelhantes de IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , sugerindo que o autotransplante é capaz de manter as funções esplênicas de um baço normal.

O IFN- $\gamma$  produzido por células T, células dendríticas, macrófagos e células NK tem a função de induzir a síntese de NO, ativando funções microbidas (REINER *et al.*, 1995). Dessa forma, a baixa produção de IFN- $\gamma$  nos animais esplenectomizados pode estar relacionada à incapacidade de ativar os mecanismos microbidas dos macrófagos como a produção de NO.

Embora o IFN- $\gamma$  tenha sido produzido, uma produção concomitante de IL-10 foi identificada. Esta citocina está então, associada à progressão da doença por exercer um papel imunorregulador, podendo inibir os efeitos do IFN- $\gamma$  e conseqüentemente a eliminação do parasito. Sabe-se que a modulação local ou sistêmica dos níveis de IFN- $\gamma$  é um determinante crítico na resolução da infecção. Além disso, o TNF- $\alpha$  produzido, sobretudo por macrófagos, LT e células NK agem juntamente com IFN- $\gamma$ , induzindo a produção de NO e conseqüentemente a morte das amastigotas no interior dos macrófagos. Assim sendo, neste trabalho nós também identificamos níveis reduzidos de TNF- $\alpha$  nos animais esplenectomizados. O TNF- $\alpha$  contribui para uma resposta imune protetora no fígado com formação de granulomas e geração de IRO e IRN,

importantes para conter o crescimento do parasito. O TNF- $\alpha$  é importante não somente na fase inicial como também na fase final da doença, visto que animais TNF- $\alpha^{-/-}$  são susceptíveis a infecção e progridem para uma infecção fatal. Além disso, a ausência de TNF- $\alpha$  muda a arquitetura do tecido linfóide, leva a perda da resistência hepática devido a pouca ou nenhuma migração de linfócitos T (ENGWERDA *et al.*, 2002). A menor produção de TNF- $\alpha$  no fígado dos animais esplenectomizados pode estar relacionada à pequena quantidade de infiltrados celulares observados quando comparados aos animais controle (MURRAY, 2001b).

A presença de poucos sítios inflamatórios no fígado pode estar relacionada à falha no controle da infecção com *L. chagasi*. Foi observado que animais submetidos à esplenectomia tiveram carga parasitária maior no fígado quando comparados aos demais grupos, o que correlaciona com um menor número de infiltrados inflamatórios e uma menor produção de TNF- $\alpha$ . Nossos dados sugerem que na ausência do baço, as leishmanias migram para o fígado, já que apresentam também um tropismo por este órgão. No entanto, sabe-se que a infecção hepática provocada por parasitos do gênero *Leishmania* é autolimitante através de uma resposta imune granulomatosa envolvendo células de Kupffer, monócitos, LT CD4+, LT CD8+, produção de NO e múltiplas citocinas incluindo IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e níveis moderados de TNF- $\alpha$  (BACELLAR e CARVALHO, 2005).

Outra citocina recentemente envolvida na imunidade contra infecções é a IL-17. Em humanos, a infecção com LV estimula a diferenciação de células Th17, com produção de IL-17, IL-22, e IFN- $\gamma$  por células mononucleares sanguíneas, promovendo reparos nos tecidos e estando dessa forma associada a proteção (PITTA *et al.*, 2009). Neste trabalho, porém, os animais submetidos à esplenectomia tiveram seus níveis de IL-17 aumentados quando comparados aos outros grupos. Sabe-se que a combinação de TGF- $\beta$  e IL-6 induz populações de linfócitos Th17 a produzirem IL-17, tanto IL-17A quanto IL-17F (LIANG *et al.*, 2007).

Apesar de o baço ser um órgão importante para a produção de imunoglobulinas e atividade dos linfócitos B, esses anticorpos não são protetores o que não elimina o baço da sua função protetora durante a LV. Além

disso, a esplenectomia ainda é um procedimento clínico comum usado para melhorar a hepatoesplenomegalia durante a esquistossomose LV em humanos (BRANDT *et al.*, 2006). No entanto, em casos de co-infecção com HIV a esplenectomia não é suficiente para controlar a leishmaniose visceral, além de colocar o paciente exposto a infecções bacterianas e outros tipos de infecções parasíticas (TROYA *et al.*, 2007).

O nosso estudo sugere um importante papel protetor do baço durante a leishmaniose visceral, visto que na sua ausência, o fígado torna-se intensamente parasitado. Além disso, como já foi demonstrado por diversos estudos, a esplenectomia torna o indivíduo mais susceptível a outros tipos de infecções, principalmente aquelas provocadas por bactérias encapsuladas. Portanto a esplenectomia pode interferir no padrão de resposta imunológica dos animais infectados com *L. chagasi*.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ A esplenectomia aumenta a suscetibilidade à infecção por *L. chagasi* em camundongos BALB/c.
- ✓ Os animais infectados com *L. chagasi* submetidos à esplenectomia (SP) apresentaram carga parasitária maior no fígado quando comparados aos animais que possuem baço intacto (CT) ou que receberam o implante autógeno de baço (AT).
- ✓ Animais do grupo SP apresentaram redução na produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 no fígado, 30 dias após a infecção por *L. chagasi*, o que pode estar correlacionado com o aumento da carga parasitária neste grupo.
- ✓ Animais do grupo SP apresentaram maior produção de IL-10 no fígado, 30 dias após a infecção por *L. chagasi*, o que pode estar correlacionado com o aumento da carga parasitária neste grupo.
- ✓ A análise histológica demonstrou menor acúmulo de células mononucleares no fígado dos animais do grupo SP, em relação aos grupos AT e CT, após 30 dias de infecção com *L. chagasi*.
- ✓ A esplenectomia influencia na resposta imunológica dos animais infectados com *L. chagasi* tornando os camundongos esplenectomizados mais susceptíveis à infecção.
- ✓ A produção de citocinas por células dos fragmentos esplênicos transplantados e a carga parasitária nesses fragmentos foi semelhante à observada no baço original, sugerindo que os fragmentos esplênicos transplantados preservam as funções imunológicas do órgão original.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5° edição, Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2005.

ALBERTI, L. R.; ROCHA, R. F.; CALDEIRA, D. A. M.; HAUTER, H.; PETROIANU, A. Postsplenectomy mortality in animal model. **Einstein**, v. 6, p. 151-154, 2008.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.; RUSSELL, D. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2993-3002, 1999.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letter**, v. 99, p.17-23, 2005.

ALMEIDA, M. C.; CARDOSO, S. A.; BARRAL-NETTO, M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 153–162, 2003a.

ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 861-870, 2003b.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 259-265, 2004.

ALVES, W. A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **Bepa**, v. 6, p. 25-29, 2009.

AMATO, V. S. Utilização do isotionato de pentamidina para o tratamento da leishmaniose mucosa. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 529-530, 1997.

AMATO, V. S.; PADILHA, A. R. S.; NICODEMO, A. C.; DUARTE, M. I. S.; VALENTINI, M.; UIP, D. E.; BOULOS, M.; AMATO, V. N. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: A pilot study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 153-157, 2000.

ARAKI, A. S.; VIGODER, F. M.; BAUZER, L. G. S. R.; FERREIRA, G. E. M.; SOUZA, N. A. Molecular and behavioral differentiation among brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **PLoS Negligence Tropical Disease**, v. 3, p. 365, 2009.

ARESU, L.; VALENZA, F.; FERROGLIO, E.; PREGEL, P.; USLENGHI, F.; TARDUCCI, A.; ZANATTA, R. Membranoproliferative glomerulonephritis type III



in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p. 569–572, 2007.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1679–1687, 2005.

ATO, M.; NAKANO, H.; KAKIUCHI, T.; KAYE, P. M. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19 **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 4815–4820, 2004.

ATTA, A. M.; D'OLIVEIRA JR, A.; CORREA, J.; ATTA, M. L. B.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E. M. Anti-Leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 59, p. 426–430, 1998.

BACELLAR, O.; OLIVEIRA, A.; JERÔNIMO, S.; CARVALHO, E. M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, p. 1228–1231, 2000.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Immunopathogenesis of visceral leishmaniasis. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, p. 24-34, 2005.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRRA, D. F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, C.; CARVALHO, W. L. P. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 195-197, 2004.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328-337, 2004.

BERNARD, N. F.; CHERNOFF, D. N.; TSOUKAS, C. M. Effect of splenectomy on T-cell subsets and plasma HIV viral titles in HIV-infected patients. **Journal of Human Virology**, v. 1, p. 338-45, 1998.

BHATTACHARJEE, S.; GUPTA, G.; BHATTACHARYA, P., MAJUMDAR, S. B.; MAJUMDAR, S. Anti-IL-10 mAb protection against experimental visceral leishmaniasis via induction of Th1 cytokines and nitric oxide. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, p. 489-497, 2009.

BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; JHONSON, P.L.; BHATTACHARYA, S. K.; MAJUMDAR, S. Immunomodulatory role of Interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase c-mediated signal transduction events. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1499-1507, 2001.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 121-134, 1998.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophage. **Parasitology Today**, v. 15, p. 22-28, 1999.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunology Veterinary**, v. 173, p. 17-26, 2000.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 59, p. 21-3, 1997.

BRANDONISIO, O.; SPINELLI, R.; PEPE, M. Dendritic cells in *Leishmania* infection **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1402–1409, 2004.

BRANDT, C. T.; CASTRO, C. M. M. B.; LAVOR, S. M. L.; CASTRO, F. M. M. Fagocitose e viabilidade monocitária de pacientes com esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica submetidos à esplenectomia e ao auto-implante esplênico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 439-445, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, 2006.

BUNN-MORENO, M. M.; MADEIRA, E. D.; MILLER, K.; MENEZES, J. A.; CAMPOS-NETO, A. Hypergammaglobulinemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activation of B cells and with suppression of T cell function. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 59, p. 427-434, 1985.

BURCHMORE, R. J. S.; BARRET, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p.1311-1320, 2001.

CALDAS, A. J. M., SILVA, D. R. C., PEREIRA, C. C. R., NUNES, P. M. S., SILVA, B. P., SILVA, A. A. M., BARRAL, A., COSTA, J. M. L. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection on childhood from endemic área of visceral leishmaniasis in the São Luis-MA, island. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 445-451, 2001.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Disease**, v.12, p. 527-548, 2006.

CAMARGO, J. B.; TRONCARELLI, M. Z.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, v.12, p. 86-92, 2007.

CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. **VITAE Academia Biomédica Digital**. <http://caibco.ucv.ve>, Número 25, 2005.

CERVIA, J. S.; ROSEN, H.; MURRAY, H. W. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 1330–1333, 1993.

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

CHRISTO, M. C. O estado da arte da cirurgia do baço, no início do século XXI. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 32, p. 279-282, 2005.

CHANDRA, D.; NAIK, S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12 p40 and activates IL-10 in cells of macrophages/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 154, p.224-234, 2008.

COIL, J. A.; DICKERMAN, J. D.; BOULTON, E. Increased susceptibility of splenectomized mice to infection after exposure to an aerosolized suspension of type III *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 21, p. 412-416, 1978.

CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M. B.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 747–754, 2005.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; Araújo, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 361-372, 1990.

COSTA, F. A. L.; GUERRA, J. L.; SILVA, S. M. M. S.; KLEIN, R. P.; MENDONÇA, I. L.; GOTO, H. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1455-1458, 2000.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75:1, p. 3-17, 2005.

COSTA, J. D.; MEIRELLES, M. N.; VELLOSO, C. E. P.; PORROZZI, R. *Leishmania chagasi*: Cytotoxic effect of infected macrophages on parenchymal liver cells. **Experimental Parasitology**, v.117, p. 390–398, 2007.

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2959-2963, 2008.

COURRET, N.; PRINA, E.; MOUGNEAU, E.; SARAIVA, E. M.; SACKS, D. L., GLAICHENHAUS, N.; ANTOINE, JEAN-CLAUDE. Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. **European Journal of Immunology**, v. 29, p. 762–773, 1999.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p.198-212, 1962.

DEMAR, M.; LEGRAND, E.; HOMMEL, D.; ESTERRE, P.; CARME, B. *Plasmodium falciparum* malaria in splenectomized patients: two case reports in French Guiana and a literature review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 290–293, 2004.

DENIAU, M.; CANAVATE, C.; FARAUT-GAMBARELLI, F.; MARTY, P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, Supplement No. 1, p. 115–133, 2003.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, p. 2061–2068, 1997.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Diseases**, v. 27, p. 305-18, 2004.

DIÓGENES, M. J. N.; GONÇALVES, H. S.; LIMA, J. W. G.; MENEZES, R. H. O.; GONÇALVES, H. M. G. Leishmanioses na infância: aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos (Estado do Ceará-Brasil). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 68, 1993.

DOTTA, S. C. N.; GARÇA, L.; ESTANGARI, R. F.; ZAPPA, V. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 12, p. 1679-7353, 2009.

ELKHOURY, M. A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2941-2947, 2008.

ENGWERDA, C. R.; MURPHY, M. L.; COTTERELL, S.E.; SMELT, S.C.; KAYE, P. M. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-

specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 669–680, 1998.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; COTTERELL, S. E. J.; MYNOTT, T. L.; TSCHANNERL, A., GORAK-STOLINSKA, P. M. A.; KAYE, P. M. A Role for tumor necrosis factor- $\alpha$  in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **American Journal of Pathology**, v. 161, p. 429-437, 2002.

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

ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; STAGER, S.; ALEXANDER, C. E.; STANLEY, A. C.; KAYE, P. M. Distinct roles for lymphotoxin- $\alpha$  and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani*. **Infection American Journal of Pathology**, v. 165, p.2123–2133, 2004.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Veterinária**. 4a ed., São Paulo: Manole, v. 1, p. 565-67, 1997.

FATOUROS, M.; BOURANTAS, K.; BAIRAKTARI, E.; ELISAF, M.; TSOLAS, O., CASSIOUMIS, D. Role of the spleen in lipid metabolism. **British Journal of Surgery**, v. 82, p.1675-1677, 1995.

FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, p. 15-24, 2010.

GALLATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; RÊGO, JR. F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 378-390, 1997.

GALVÃO-CASTRO, B.; SA FERREIRA, J.A., MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI, M.C.; COUTINHO,S. G.; LAMBERT, P. H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. **Journal Clinical Experimental Immunology**, v. 56, p. 580-66, 1984.

GANTT, K. R.; GOLDMAN, T. L.; MCCORMICK, M. L.; MILLER, M. A.; JERONIMO, S. M. B.; NASCIMENTO, E. T.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 893–901, 2001.

GARG, R.; BARAT, C.; OUELLET, M.; LODGE, B.; TREMBLAY, M. J. *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and cd4+ t cells by inducing secretion of IL-6 and TNF- $\alpha$ . **PLoS Negligence Tropical Disease**, v.3, p.1-11, 2009.

GEIJTENBEEK, T. B. H.; GROOT, P. C.; NOLTE, M. A.; VLIET, S. J.; GANGARAM-PANDAY, S. T.; DUIJNHOF, G. C. F.; KRAAL, G.; OOSTERHOUT, A. J. M.; KOOYK, Y. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. **Blood**, v. 100, p. 2908-2916, 2002.

GOMES, N. A.; GATTASS, C. R.; BARRETO-DE-SOUZA, V.; WILSON, M. E.; REIS, G. A. TGF- $\beta$  Mediates CTLA-4 Suppression of cellular immunity in murine kalazar. **The Journal of Immunology**, v.164, p. 2001–2008, 2000.

GOMES, L. M. X.; COSTA, W. B.; PRADO, P. F.; CAMPOS, M. O.; LEITE, M. T. S. Características clínicas e epidemiológicas da leishmaniose visceral em crianças. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, p. 549-55, 2009.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GORAK, P. M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 687–695, 1998.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 615-623, 2004.

GOTO, H.; PRIANTI, M. G. - Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 51, p. 241-246, 2009.

GRIMALDI JR, G.; TESH, R.B.; MEMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v, 41, p. 687-725, 1989.

HOLADAY, B. J.; POMPEM, M. L.; GERONIMO, S.; TEIXEIRA, M. J.; SOUZA, A.Q.; VASCONCELOS, A. W.; PEARSON, R.D.; ABRAMS, J.S.; LOCKSLEY, R. M. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kalar-azar. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 2626-2632, 1993.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J.-L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, v. 132, p. 19–32, 2006.

HOU, B.; REIZIS, B.; DEFRANCO, A. L. Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and extrinsic mechanisms. **Immunity**, v. 29, p. 272–282, 2008.

IKEDA, F. A.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; FEITOSA, M. M.; MACHADO, G. F.; PERR, S. H. V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animals Science**, v. 44, p. 5-11, 2007.

JANEWAY, C. A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1167-71, 2001.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **IMUNOBIOLOGIA: O sistema imune na saúde e na doença**. Editora Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. 5ª EDIÇÃO, 2002.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v.166, p. 1141–1147, 2001.

KANG, S. C.; CHOUDHRY, M. A.; MATSUTANI, T.; SCHWACHA, M. G.; RUE, L. W.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Splenectomy differentially influences immune responses in various tissue compartments of the body. **Cytokine**, v. 28, p. 101-108, 2004.

KARAGÜLLE, E., HOFICOFIKUN, Z., KUTLU, A. K., KAYA, M., BAYDAR S. The effectiveness of splenic autotransplantation: an experimental study. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery**, v.13, p.13-19, 2007.

KAYE, P. M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C.R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunology Reviews**, v. 201, p. 239-53, 2004.

KEMP, K.; KEMP, M.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KURTZHALS, J. A. L.; HVIID L.; THEANDER, T. G. *Leishmania*-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 116, p. 500-504, 1999.

KEMP, K. Cytokine-producing T cell subsets in human leishmaniasis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 48, p. 173–176, 2000.

KYBER, E.; UBER, D. M. D. M.; EINIGER, S. **Archive Mike Anatomy Entwicklungs Mech**, v, 6, p. 540-70, 1870.

KING, H.; SCHUMACKER, H. Splenic studies: susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. **Annals of Surgery**, v.136, p. 239-42, 1952.

KORBEL, D. S.; FINNEY, O. C.; RILEY, E. M. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1517–1528, 2004.

KOSTKA, S. L.; DINGES, S.; GRIEWANK, K.; IWAKURA, Y.; UDEY, M. C.; STEBUT, E. VON. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 3039–3046, 2009.

KURANAGA, N.; KINOSHITA, M.; KAWABATA, T.; SHINOMIYA, N.; SEKI, S. A defective Th1 response of the spleen in the initial phase may explain why splenectomy helps prevent a *Listeria* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 140, p.11–21, 2005.

LEAVY, O. Self-control by TH1 cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 7 , 2007.

LEEMANS, R.; HARMS, G.; RIJKERS, G. T.; TIMENS, W. Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 117, p. 596-604, 1999.

LESSA, M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T. W. N.; OLIVEIRA, ADJA.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E. M. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, p. 843-847. 2007.

LIANG, S. C.; LONG, A. J.; BENNETT, F.; WHITTERS, M. J.; KARIM, R.; COLLINS, M.; GOLDMAN, S. J.; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K.; WILLIAMS, C. M. M.; WRIGHT, J. F.; FOUSER, L. A. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 7791–7799, 2007.

LIKHTE, V. V. Protection against fulminant sepsis in esplenectomized mice by implantation of autochthonous splenic tissue. **Experimental Hematology**, v. 6, p. 433-39, 1978.

LIMA, A. S.; PIMENTA, L. G. Visão crítica dos métodos de tratamento do trauma esplênico. **Revista Paulista de Medicina**, v. 105, p. 226-234, 1987.

LUKES, J.; MAURÍCIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; TINTAYA, Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNIK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M.A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, p.9375-9380, 2007.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p. 647-664, 2004.

MAGALHÃES, V. P.; MARTINS-FILHO, O. A.; PRATA, A.; SILVA, L. A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R. M. S.; GUIMARÃES-CARVALHO, F.; FERRARI, T. C. A.; WEYENBERGHAND, J.



Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- $\alpha$  in monocytes are hallmarks of active human visceral leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, p. 124–132, 2006.

MAIA, C.; ROLÃO, N.; NUNES, M.; CAMPINO, L. Infectivity of *Leishmania infantum* treated with amphotericin B plus Phlebotomus salivary gland in BALB/c mice. **International Journal of Integrative Biology**, v. 6, p. 105-111, 2009.

MAIOLI, T. U.; CARNEIRO, C. M.; ASSIS, F. A.; FARIA, A. M. C. Splenectomy does not interfere with immune response to *Leishmania major* infection in mice. **Cellular Immunology**, v. 249, p. 1–7, 2007.

MALFAIA, G. O sinergismo entre a desnutrição proteico-calórica e a Leishmaniose visceral. **Revista saúde.com**, v. 4, p.134-147, 2008.

MALLA, N.; MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis: some recent concepts. **Indian Journal of Medicine Research**, v. 123, p. 267-74, 2006.

MARQUES, R. G.; PETROIANU, A.; COELHO, J. M. C. O.; PORTELA, M. C. Regeneration of splenic autotransplants. **Annals of Hematology**, v. 81, p. 662-626, 2002a.

MARQUES, R. G.; PETROIANU, A.; OLIVEIRA, M. B. N.; BERNARDO FILHO, M. Importância da preservação de tecido esplênico para a fagocitose bacteriana. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 388-93, 2002b.

MARQUES, R. G.; PETROIANU, A.; COELHO, J. M. C. O. Bacterial phagocytosis by macrophage of autogenous splenic implant. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 491-495, 2003.

MARQUES, R. G.; PETROIANU, A. Infecção fulminante pós-esplenectomia. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 40(1), p. 47-54, 2003.

MARQUES, R. G.; PETROIANU, A.; COELHO, J. M. C. O.; PORTELA, M. C. Morfologia e função fagocitária de implante esplênico autógeno regenerado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, p. 642-648, 2004.

MARQUES, M.J.; VOLPINI, A. C.; MACHADO-COELHO, G. L.; MACHADO-PINTO, J.; DA COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; ROMANHA, A. J. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, p. 37-43, 2006.

MARQUEZ, F. J. R. Tratamiento quirúrgico conservador en traumatismos de bazo. **Trauma**, v. 4, p. 14-21, 2001.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. A. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Reviews Immunology**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MATHIAS, R.; COSTA, F. A. L.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 539-543, 2001.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 33, p. 1145-9, 1995.

MATSUZAKI, G.; UMEMURA, M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against. **Infections Microbiology Immunology**, v. 51, p. 1139-1147, 2007.

McELRATH, M. J.; MURRAY, H. W.; COHN, Z. A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 1927-1937, 1988.

McFARLANE, E.; PEREZ, C.; CHARMOY, M.; ALLENBACH, C.; CARTER, K. C.; ALEXANDER, J.; TACCHINI-COTTIER, F. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v.76, p. 532–541, 2008.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 606-616, 2005.

MELBY, P. C.; YANG, J.; ZHAO, W.; PEREZ, L. E.; CHENG, J. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA Vaccine Is Highly Immunogenic but Not Protective Against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 4719–4725, 2001.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5515-9, 2005.

MILES, S. A.; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M. B.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 747–754, 2005.

MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 104, p. 9375–9380, 2007.

MIRALLES, G. D.; STOECKLE, M. Y.; MCDERMOTT, D.F.; FINKELMAN, F. D.; MURRAY, H. W. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1058–1063,1994.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, p.29–45, 2003.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Visceral leishmaniasis: a study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 147-152, 2005.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 7<sup>a</sup> ed, São Paulo: Elsevier 2004.

MORRIS, D. H.; BULLOCK, F. D. The importance of the spleen in resistance to infection. **Annals of Surgery**, v. 70, p. 513-21,1919.

MURPHY, M. L.; COTTERELL,S. E. J.; GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Blockade of CTLA-4 Enhances host resistance to the intracellular pathogen, *Leishmania donovani*. **Journal of Immunology**, v.161, p. 4153–4160, 1998.

MURRAY, H. W.; SQUIRES, K. E.; MIRALLES, C.D.; STOECKLE, M.Y.; GRANGER, A.M.; GRANELLI-PIPERNO, A.; BOGDAN, C. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. **Journal of Immunology**, v.148, p.1858-1863,1992.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 741–746, 1999.

MURRAY, H. W.; JUNGBLUTH, A.; RITTER, E.; MONTELIBANO, C.; MARINO, M. W. Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. **Infection and Immunity**, v. 68, p.6289–6293, 2000a.

MURRAY, H. W.; MONTELIBANO, C.; PETERSON, R.; SYPEK, J. P. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p.1497–502, 2000b.

MURRAY, H. W. Clinical and Experimental Advances in Treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2185–2197, 2001a.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v.82, p.249-267, 2001b.

MURRAY, H. W.; LU, C. M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A. L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R. L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6284-6293, 2002.

NASCIMENTO M. D. S. B.; SOUZA, E. C.; SILVA, L. M.; LEAL, P. C.; CANTANHEDE, K. L.; BEZERRA, G. F. B.; VIANA, G. M. C. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermorreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, p. 1801-1807, 2005.

NASCIMENTO M. D. S. B.; BEZERRA, G. F. B.; BANDEIRA NETO, A. P.; SILVA, L. M.; BEZERRA, J. M.; VIANA, G. M. C. Estudo comparativo de anticorpos IgG e IgE antileishmania como marcadores de infecção e doença em indivíduos de área endêmica de leishmaniose visceral, em São Luis, MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 38-42, 2006a.

NASCIMENTO, M. D. S. B.; CANTANHEDE, K. L.; LEAL, P. C.; SILVA, L. M.; BEZERRA, G. F. B.; VIANA, G. M. C. Leishmaniose visceral no passado: significado da soropositividade para IgG antileishmania em área endêmica da doença. **News Lab**, v. 79, p. 82-94, 2006b.

NASCIMENTO, E. L. T.; MARTINS, D. R.; MONTEIRO, G. R.; BARBOSA, J. D.; XIMENES, M. F. F. M.; MACIEL, B. L.; DUARTE, I.; JERÔNIMO, S. M. B. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2964-2967, 2008.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005.

NOAZIN, S.; MODABBER.; KHAMESIPOUR, A.; SMITH, P. G.; MOULTON, L. H.; NASSERI, K.; SHARIFI, I.; KHALIL, E. A. G.; BERNAL, I. D. V.; ANTUNES, C. M. F.; KIENY, M. P.; TANNER, M. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine**, v. 26, p. 6759–6767, 2008.

NUNES, S. I.; REZENDE, A. B.; TEIXEIRA, F. M.; FERREIRA, A. P.; ALVES, M. M. J.; JAMEL, N.; ASSIS, R. V. C.; TEIXEIRA, H. C. Antibody response of autogenous splenic tissue implanted in the abdominal cavity of mice. **World Journal of Surgery**, v. 29, p.1623-1629, 2005.

NYLÉN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 805–817, 2007.

OLIVEIRA, C. L.; MORAIS, M. H. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2953-2958, 2008a.

OLIVEIRA, Í. M.; SILVEIRA, K. P.; BARROSO, T. A.; OLIVEIRA, S. A. J.; TEIXEIRA, M. L.; SILVA FILHO, A. R. Correlação da segmentação arterial esplênica com a anatomia de superfície. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, p. 406-410, 2008b.

OLIVIER, M.; BADARÓ, R.; MEDRANO, F. J.; MORENO, J. The pathogenesis of Leishmania/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, p. 79–98, 2003.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 293–305, 2005.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 257-66, 2004.

OZBILGE, H.; AKSOY, N.; GUREL, M. S.; YAZAR, S. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1329–1331, 2006.

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

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v.78, p. 120-127, 2002.

PATEL, J., WILLIAMS, J. S., SHMIGEL, B., HINSHAW, J. R. Preservation of splenic function by autotransplantation of traumatized spleen in man. **Surgery**, v. 90, p. 683-8, 1981.

PEDROSA, C. M. S.; ROCHA, E. M. M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 300-304, 2004.

PEREIRA, S. A. L.; CORRÊA, B. S.; MINICUCCI, G. P.; LOPES, G. M. A.; CASTRO, E. C. C.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Weight of the spleen in chronic chagasic patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 167-170, 1999.

PEROBELLI, S. M. Implicações da esplenectomia e do transplante autógeno de baço na resposta imunológica contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*

em camundongos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2008.

PETROIANU, A. Aspectos históricos do baço e da cirurgia esplênica. In: O baço São Paulo: **CRL Balieiro**, Cap. 1, p. 3-15, 2003a.

PETROIANU, A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e auto implante esplênico autógeno. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 25, p. 25-30, 2003b.

PETROIANU, A. Mortalidade após esplenectomia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p.103-108, 2007.

PETROIANU, A.; RESENDE, V.; SILVA, R. G.; ALBERTI, L. R. Late follow-up of patients submitted to subtotal splenectomy:late clinical, laboratory, imaging and functional with preservation of the upper splenic pole. **Einstein**, v. 6, p. 247-52, 2008a.

PETROIANU, A.; BRANDT, C. T.; ALENCAR, L. F. Partial splenectomy for treatment of splenic hemangioma. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, p. 132-135, 2008b.

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P. M. G.; 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, p. 237–243, 1999.

PISTERS, P. W. T.; PACTER, H. L. Autologous splenic transplantation for splenic trauma. **Annals of Surgery**, v. 219, 225-235, 1994.

PITTA, M. G. R.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A.; KOURIBA, B.; ARGIRO L.; 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*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p.2379–2387, 2009.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2948-2952, 2008.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.

REBELO, J. M. M.; MENDES, W. A.; COSTA, J. M. L.; CAVALEIRO, N. Preliminary check list of species from the genus *Lutzomyia*, França, 1924 (Psychodidae, Phlebotominae) from the State of Maranhão, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 12, p. 545-549, 1996.

REINER, N. E. Host-parasite relationship in murine leishmaniasis: pathophysiological and immunological changes. **Infection and Immunity**, v. 38, p.1223-1230, 1982.

REINER, S. L., LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annals Review Immunology**, v.13, p.151-77. 1995.

RESENDE, V.; PETROIANU, A., Late functional study of human spleen autotransplantation after severe splenic injuries. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 28, p. 167-172, 2001.

RESENDE, V.; PETROIANU, A.; JUNIOR, W. C. T. Autotransplantation for treatment of severe splenic lesions. **Emergency Radiology**, v. 9, p. 208-212, 2002.

RESENDE, V.; PETROIANU, A. Funções do remanescente esplênico após esplenectomia subtotal para o tratamento de lesões complexas do baço humano. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, p. 26-31, 2002.

REY, L. **Parasitologia**. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2ª Edição, 731 pp., 1991.

REZENDE, A. B.; NUNES, S.I.; FARIAS, R. E.; VIEIRA, F. R.; PETROIANU, A.; TEIXEIRA, H. C. Influence of the spleen, asplenism and autologous splenic implants on lipid metabolism in mice. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 34, p. 177-182, 2007.

RIBEIRO, J. A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazil Journal of Medical Biology Research**, v. 31, p. 143-148, 1998.

RODRIGUES, O. R.; MARQUES, C.; SOARES-CLEMENTE, M.; FERRONHA M. H.; SANTOS-GOMES, G. M. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology**, v. 214, p. 101–111, 2009.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J. F.; ANJUÈRE, F.; FRAGAKI, K.; FICHOUX Y. L.; KUBA, J. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiology**, v. 1, p. 1:17, 2001.

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 671–678, 2007.

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

SALOTRA, P.; SREENIVAS, G.; POGUE, G. P.; LEE, N., NAKHASI, H.L.; RAMESH, V. Development of a species-specific PCR assay for detection of

*Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 849-54, 2001.

SAMPAIO, R. N. R.; MARSDEN, P. D. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B liposomal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 125-128, 1997.

SAMPAIO, R. N. R.; PAULA, C. D. R.; JOÃO SAMPAIO, H. D.; FURTADO, R. S.; LEAL, P. P.; ROSA, T. T.; RODRIGUES, M. E.; VEIGA, J. P. R. Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do antimonial pentavalente administrado na dose de 40MG sBV/kg/dia, de 12/12H, por 30 dias na forma cutâneo-mucosa de leishmaniose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 457-463, 1997.

SANCHEZ, A. S. Trauma esplênico. **Trauma**, v. 4, p. 7-13, 2001.

SANTANA, J. A. P.; LIMA, W. G.; OLIVEIRA, M. R.; SIMÕES, L. A.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. G. L. Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1137-1144, 2007.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; FREITAS, L. A. R.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTESDE-CARVALHO, L. C.; DOS SANTOS, W. L. C. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v.30, p.515-524, 2008.

SARTORI, A.; OLIVEIRA, A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; ROSSI, M. A.; CAMPOS-NETO, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kalazar. **Parasite Immunology**, v.9, p. 93-103, 1987.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p.420-425, 2007.

SILVA, Jr. J.B. Antimoniato de meglumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p.103-105, 2001.

SILVA, R. G.; PETROIANU, A.; SILVA, M. G.; DINIZ, S. O. F.; CARDOSO, V. N. Influence of surgical procedures on spleen on distribution of *Escherichia coli* in mononuclear phagocyte system. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 30, p. 65-71, 2003.

SILVEIRA, L.; BOTELHO, J.; PATRÍCIO, J. Autotransplante do baço estudo experimental. **Arquivos Portugueses de Cirurgia**, v.11, p. 117-121, 2002.

SINGER, D. B. Postsplenectomy sepsis. **Perspectives in Pediatric Pathology**, v.1, p. 285-311, 1973.



SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.10, p. 307–315, 2004.

SIPKA JR, S.; BRÁTH, E.; TÓTH, F. F.; ALEKSZA, M.; KULCSÁR, A.; FABIAN, Á.; BARÁTH, S.; BALOGH, P.; SIPKA, S.; FURKA, I.; MIKÓ, I. Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice . **Transplant Immunology**, v. 16, p. 99–104, 2006.

SOUZA, J. C. L.; ATHIÊ, M. E.; RAHAL, F.; FAGUNDES, D. J. Estudo da regeneração esplênica autóloga e heterotópica em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, p. 253-257, 2005a.

SOUZA, M. A.; SILVA, A. G.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; JUNIOR, S. F.; FERREIRA, M. S. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p.137-141, 2005b.

SOUZA, G. F. Comparação de aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose visceral entre portadores e não portadores do vírus da imunodeficiência humana. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

STAGER, S.; ALEXANDER, J.; K. CARTER, C.; BROMBACHER, F.; KAYE, P. M. Both Interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor-signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4804–4807, 2003.

SUMARAJU, V.; SMITH, L. G.; SMITH, S. M. Infectious complications in asplenic hosts. **Infection Disease Clinical North American**, v. 15, p. 551-65, 2001.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, p. 951–958, 2002.

TAFURI, L. W.; TAFURI, L. W.; BARBOSA, A. J. A.; MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopatology and immunohistochemical study of type 3 e type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 38, p.81-89, 1996.

TAYLOR, A. P.; MURRAY, H. W. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon  $\gamma$ : effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferon  $\gamma$  gene-disrupted mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, p. 1231–1239, 1997.

TEIXEIRA, F. R.; FERNANDES, B. F.; REZENDE, A. B.; MACHADO, R. R. P.; ALVES, C. C. S.; PEROBELLI, S. M.; NUNES, S. I.; FARIAS, R. E.; RODRIGUES, M. F.; FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, S. C.; TEIXEIRA, H. C.

*Staphylococcus aureus* infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 154, p. 255–263, 2008.

TIMENS, W., LEEMANS, R. Splenic Autotransplantation and the Immune System. **Annals of Surgery**, v. 215, p. 256-260, 1992.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **Journal of Experimental Medicine**, v. 12, p. 1-5, 2007.

TROYA, J.; CASQUERO, A.; MUNIZ, G.; FERNANDEZ-GUERRERO, M. L.; GORGOLAS, M. The role of splenectomy in HIV-infected patients with relapsing visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.134, p. 621–624, 2007.

UPADHYAYA, P. Conservative management of splenic trauma: history and current trends. **Pediatric Surgery International**, v. 19, p.617-627, 2003.

VERÇOSA, B. L. A.; LEMOS, C. M.; MENDONÇA, I. L.; SILVA, S. M. M. S.; CARVALHO, S. M.; GOTO, H.; COSTA, F. A. L. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p.1-7, 2008.

WAISBERG, J.; DIAS, A. R. N.; ARAUJO, L. M.; OETTING JR., A.; ESPERANZINI, M. B. Bases fisiológicas da asplenia. **Arquivo Médico**, v. 16, p. 7-13, 1993.

WERNECK, G. L.; PEREIRA, T. J. C. F.; FARIAS, G. C.; SILVA, F. O.; CHAVES, F. C.; GOUVÊA, M. V.; COSTA, C. H. N.; CARVALHO, F. A. A. Assessment of the Effectiveness of Control Strategies for Visceral Leishmaniasis in the City of Teresina, State of Piauí, Brazil: Baseline Survey Results. – 2004. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, p. 87-96, 2008.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 363-369, 1988.

WILSON, M. E.; WEINSTOCK, J. V. Hepatic granulomas in murine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. **Methods: a Companion to Methods in Enzymology**, v. 9, p. 248–254,1996.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, p.147-160, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva. Weekly epidemiological record. **Weekly Epidemiological Record**, v. 77, p. 365–372, 2002.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 272-278, 2002.