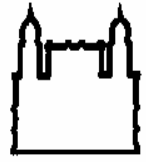




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**DESESTRUTURAÇÃO DA POLPA BRANCA DO BAÇO NA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:
CÉLULAS E CITOCINAS ENVOLVIDAS**

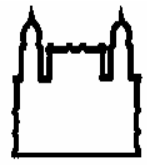
JOSELLI SANTOS SILVA

Salvador – Bahia – Brasil

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**DESESTRUTURAÇÃO DA POLPA BRANCA DO BAÇO NA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:
CÉLULAS E CITOCINAS ENVOLVIDAS**

JOSELLI SANTOS SILVA

Orientador: Washington Luis Conrado dos Santos

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Doutor.

Salvador – Bahia – Brasil

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia

S586d Silva, Joselli Santos
Desestruturação da polpa branca do baço na Leishmaniose visceral canina:
células e citocinas envolvidas. [manuscrito] / Joselli Santos Silva. - 2014.
187 f. : il.; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).
Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo
Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.
Orientador: Prof^o Dr. Washington Luis Conrado dos Santos. Laboratório de
Patologia e Biointervenção.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Plasmocitose. 3. Baço. 4. Quimiocina
CXCL13. 6. Quimiocina CXCL12. I.Título.

CDU 616.993.161

“POR QUE O SENHOR DÁ A SABEDORIA E DA SUA BOCA VEM A
INTELIGÊNCIA E O ENTENDIMENTO. ELE RESERVA A
SABEDORIA PARA OS RETOS; É ESCUDO PARA OS QUE
CAMINHAM NA SINCERIDADE...”
PROVÉRBIOS DE SALOMÃO (CAPÍTULO 2, VERSOS 6 E 7)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu amado Pai e amigo: “Nunca me deixe esquecer que tudo que tenho, tudo que sou e tudo o que vier a ser, vem de Ti Senhor...”

Ao Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, que tem me orientado no sentido mais apropriado da palavra. Meu profundo agradecimento pelos ensinamentos, pela atenção, amizade e incentivo constantes.

A minha família, em especial a minha mãe Lili, seu amor e dedicação são essenciais na minha vida e nas minhas conquistas. Ao meu amor, Jeremy O'Hare pela presença doce e constante, além da correção do Abstract contido nessa tese.

Dr. Deborah Dunn-Walters que foi minha co-orientadora durante meu estágio sanduiche, que foi um período muito valioso para minha formação durante o doutorado.

A Thaís Carvalho dos Santos e Isadora dos Santos Lima, que foram estudantes de iniciação científica e amigas, que contribuíram com experimentos de imunoistoquímica.

A amiga Micely Del'Rei Hermida, que contribui de forma tão voluntária com seus comentários enriquecedores, com o auxílio gráfico e o mais importante, com a amizade, dedicação e apoio durante essa jornada.

A Valter, Djalma e Maria pela amizade e companheirismo que contribuíram para que os dias fossem mais agradáveis ainda na Fiocruz.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção pela agradável convivência, amizade e momentos memoráveis na copa.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

À Fiocruz e ao CPqGM, pela infra-estrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	1
CAPÍTULO 1	14
INTRODUÇÃO	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 A Leishmaniose Visceral	18
2.2 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	22
2.3 O Baço	25
3. OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
CAPÍTULO 2	43
EXPRESSÃO ANÔMALA DA QUIMIOCINA CXCL13 ASSOCIADA COM A REDISTRIBUIÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES DO BAÇO NA LVC	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1 Desenho experimental	46
2.2 DETALHAMENTO DA METODOLOGIA	46
3. RESULTADOS	61
3.1 Características gerais da amostra de cães	61
3.2 Distribuições da polpa vermelha e compartimentos da polpa branca em baços desorganizados	62
3.3 Distribuição das populações celulares do baço	63
3.4 Análise morfométrica quantitativa	65
3.5 Expressão de citocinas do baço de cães	69
4. DISCUSSÃO	72
CAPÍTULO 3:	77
DESESTRUTURAÇÃO LINFÓIDE E PLASMOCITOSE ESPLÊNICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: POTENCIAIS ALTERAÇÕES NO HOMING E SOBREVIVÊNCIA DE LINFÓCITOS B TERMINAIS	77

1. INTRODUÇÃO-----	78
2. MATERIAIS E MÉTODOS -----	80
2.1 Desenho experimental-----	80
2.2 DETALHAMENTO DA METODOLOGIA -----	80
4. RESULTADOS-----	89
4.1 Características gerais da amostra de cães -----	89
4.2 Análises histológicas dos baços de cães com LV -----	91
4.3 Análises bioquímicas dos soros de cães com LV -----	92
4.4 Distribuições das populações celulares do baço-----	93
4.5 Análises morfométricas quantitativas -----	96
4.5 Perfis eletroforéticos das proteínas séricas de cães com Leishmaniose visceral-----	99
4.6 Resposta inespecífica de IgG contra antígenos protéicos-----	100
4.7 Expressões de citocinas do baço de cães-----	100
4. DISCUSSÃO-----	102
CAPÍTULO 4-----	108
IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE IMUNOGLOBULINA NA LINHAGEM	
GERMINATIVA DO GENOMA CANINO -----	108
1. INTRODUÇÃO-----	109
2. MATERIAIS E MÉTODOS -----	112
2.1 Critérios para busca dos segmentos IGVH, IGDH e IGJH na linhagem germinativa canina -----	112
2.2 Análises das sequencias obtidas-----	113
2.3 Definições das famílias de genes IGHV -----	114
3. RESULTADOS-----	115
3.1 Genes VH selecionados na linhagem germinativa canina-----	115
3.2 Genes Dh selecionados na linhagem germinativa canina -----	123
3.3 Genes Jh selecionados na linhagem germinativa canina -----	124
4. DISCUSSÃO-----	125
CAPÍTULO 5-----	127
DISCUSSÃO GERAL -----	127
CAPÍTULO 6-----	132
CONCLUSÕES -----	133

CAPÍTULO 7	133
REFERÊNCIAS	
CAPÍTULO 8	149
ANEXOS	149

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico mostrando o número de casos de Leishmaniose Visceral no Brasil nos últimos 26 anos.	19
Figura 2. Representação dos aspectos histológicos da Leishmaniose visceral.....	19
Figura 3. Desenho esquemático dos compartimentos do baço. Principais células e quimiocinas envolvidas na organização desses compartimentos.....	29
Figura 4. Microfotografias representativas de polpa branca esplênica organizada.....	51
Figura 5. Definições dos compartimentos esplênicos considerados na morfometria.....	54
Figura 6. Fotografia de um gel de agarose, demonstrando a integridade dos RNA extraídos dos baços dos cães de uma área endêmica para LV.. ..	55
Figura 7. Cromatograma referente ao seqüenciamento do produto amplificado com o primer 18S.....	57
Figura 8. Distribuição de linfócitos B, linfócitos T, células dendríticas foliculares e células em proliferação.....	64
Figura 9. Densidade de células B.....	65
Figura 10. Densidade de células proliferantes.....	66
Figura 11. Número total de células B CD79+ em cada compartimento esplênico.	67
Figura 12. Número total de células FDC S100+ em cada compartimento esplênico.	68
Figura 13. Número total de células proliferantes Ki67+.	68
Figura 14. Número total de células T CD3+.....	69
Figura 15. Expressão dos RNAm de citocinas em baço relativo a expressão de 18S.....	70
Figura 16. Expressão dos RNAm de citocinas em baço relativo a expressão de β actina..	71

Figura 17. Frações protéicas obtidas após a eletroforese utilizando soros dos animais dos diferentes grupos.	87
Figura 18. Caracterização clínica, laboratorial e diagnóstica dos diferentes grupos de cães.....	89
Figura 19. Caracterização clínica, laboratorial e diagnóstica dos diferentes grupos de cães.....	90
Figura 20. Plasmocitose. Microfotografia representativa de plasmocitose intensa em polpa vermelha do baço de cães de área endêmica para LV (1000X).	91
Figura 21. Avaliação semi-quantitativa de plasmocitose. Densidade relativa de plasmócitos em polpa vermelha de baço de cães de uma área endêmica para LV.....	92
Figura 22 Razão globulina/albumina. Resultados das análises bioquímicas dos soros dos cães de uma área endêmica para LV.....	92
Figura 23 Distribuição de plasmócitos secretores de IgG.....	94
Figura 24. Distribuição de plasmócitos secretores de IgM.	95
Figura 25. Densidade de plasmócitos secretores de IgG.....	96
Figura 26. Densidade de plasmócitos secretores de IgM.	98
Figura 27. Porcentagens das diferentes frações proteicas presentes no soro dos cães de uma área endêmica para LV.	99
Figura 28. Concentrações séricas de anticorpos específicos da classe IgG produzidos contra diferentes antígenos protéicos (KLH e OVA) quando incubados com soros dos animais dos três grupos analisados nesse estudo.....	100
Figura 29. Expressão dos RNAm de citocinas em baços organizados e desorganizado, relativo a expressão de 18S, expresso em Log10.....	101
Figura 30. Exemplo das sequências selecionadas alinhadas.....	113
Figura 31. Exemplo de uma árvore filogenética obtida após alinhamento de parte das sequencias selecionadas.	114
Figura 32. Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes VH obtidos na linhagem germinativa canina..	116
Figura 33. Árvore filogenética gerada através do programa Megalign.	122
Figura 34 Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes DH obtidos na linhagem germinativa canina.	123

Figura 35. Árvore filogenética gerada através do programa Megalign mostrando as relações filogenéticas dos genes DH.	123
Figura 36. Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes JH obtidos na linhagem germinativa canina.	124
Figura 37. Árvore filogenética gerada através do programa Megalign mostrando as relações filogenéticas dos genes JH.	124
Figura 38. Histologia do aspirado esplênico processado através da técnica de cell-block e corado com HE.	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados na fenotipagem de esplenócitos.....	52
Tabela 2. Sequências de primers e temperatura de anelamento utilizadas na PCR em tempo real.	58
Tabela 3. Características gerais da amostra de animais de uma área endêmica para leishmaniose visceral.	61
Tabela 4. Estimativa das áreas representadas pelos diferentes compartimentos dos baços de cães naturalmente infectados com Leishmania.....	62
Tabela 5. Anticorpos específicos para marcação de plasmócitos secretores de diferentes isotipos de imunoglobulinas que foram utilizados na fenotipagem.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 6. Sequências de primers e temperatura de anelamento utilizadas na PCR em tempo real.	84
Tabela 7. Sequência dos primers utilizados na PCR em tempo real para detecção de DNA de Leishmania	86
Tabela 8. Características gerais da amostra de cães, provenientes de uma área endêmica de leishmaniose visceral, a cidade de Jequié - Brasil.	90
Tabela 9. Densidade de células IgG+ (plasmócitos secretores de IgG) nos diferentes compartimentos esplênicos de cães de uma área endêmica para LV	97
Tabela 10. Densidade de células IgM+ (plasmócitos secretores de IgM) nos diferentes compartimentos esplênicos de cães de uma área endêmica para LV.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Nomenclatura sistematizada de moléculas (do inglês <i>cluster differentiation</i>)
CCR	Receptor de quimiocinas contendo 2 resíduos de cisteína juntos
CCL	Ligantes de quimiocinas contendo 2 resíduos de cisteína juntos
CG	C entro G erminativo (parte do folículo esplênico)
CRs	Receptores de complemento (do inglês <i>complement receptors</i>)
CXCR	Receptores de quimiocina com mais de dois resíduos de cisteína juntos
CXC	Ligantes de quimiocinas com mais de 2 resíduos de cisteína juntos
DAB	D iaminobenzidina (cromógeno usado da revelação de imunohistoquímica)
DC	Células dendríticas (do inglês <i>Dendritic Cell</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DTH	Reação de hipersensibilidade tardia (do inglês <i>Delayed Type Hypersensitivity</i>)
cDNA	DNA complementar (do inglês C omplementary DNA)
FDC	Célula dendrítica folicular (do inglês <i>Follicular dendritic cell</i>)
ELISA	Ensaio imuno enzimático. (do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
FOL	F olículo E splênico
IDC	Célula Interdigitante do estroma esplênico (do inglês <i>Interdigitant Cell</i>)
IFNγ	Interferon g ama (Citocina)
IL	Interleucina
LV	L eishmaniose V isceral
LT	L infotoxina (Citocina)
LVC	L eishmaniose V isceral C anina
MMM	M acrófago M etalofílico presente na Zona Marginal esplênica
MT	Região do Manto (parte do folículo esplênico)
MZM	M acrófago de Z ona M arginal
PALS	Bainha periarteriolar de linfócitos (do inglês <i>Periarteriolar lymphoids sheat</i>). Região da polpa branca esplênica.

PB	P olpa B ranca esplênica
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês P olymerase C hain R eaction)
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês P hosphate b uffered s aline)
PV	P olpa V ermelha esplênica
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês R ibonucleic A cid)
RT- PCR	Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês T h elper- 1)
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2 (do inglês T h elper- 2)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês T umoral N ecrosis F actor)
ZM	Z ona M arginal (região da polpa branca esplênica)

RESUMO

SILVA, Joselli Santos. Desestruturação da polpa branca do baço na leishmaniose visceral canina: células e citocinas envolvidas. 183f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

A leishmaniose visceral está associada às alterações arquiteturais esplênicas e redistribuição de populações celulares envolvidas na resposta imunológica. Os objetivos desta tese foram estudar a desestruturação da polpa branca do baço na leishmaniose visceral canina e quais as células e citocinas envolvidas nesse processo. Para isso, amostras de baços de cães de uma área endêmica para LV foram agrupadas em três categorias: TIPO1-CONT ou TIPO1-SIA (cães não infectados ou sem infecção ativa e com polpa branca organizada), TIPO1-INF (cães infectados com polpa branca organizada) e TIPO3-INF (cães infectados com polpa branca desorganizada). No capítulo 2 e 3, as secções de baço foram marcadas através de imunistoquímica com anticorpos anti-CD3 (linfócitos T), anti-CD79- α (linfócitos B), anti-S100 (célula dendrítica folicular), anti-Ki-67 (células em proliferação), anti-IgG e anti-IgM (plasmócitos secretores de IgA, IgG e IgM). Foram estimadas as densidades de todas as populações celulares através de morfometria. As expressões de citocinas e quimiocinas foram avaliadas através de RT-PCR em tempo real. A ativação policlonal de células B e hipergamaglobulinemia foram avaliadas por ELISA e eletroforese de proteínas séricas. No capítulo 2, foi visto que a densidade de linfócitos B foi maior nos folículos e na zona marginal dos animais com baço TIPO1 do que nos dos animais com baço TIPO3 (teste de Mann-Whitney $P < 0,02$). Os números de células proliferantes, células B e células dendríticas foliculares foram menores em animais de baço TIPO3. A expressão da quimiocina CXCL13 foi maior nos animais com baço TIPO 1 (teste de Mann-Whitney, $P < 0,02$). No capítulo 3, foi visto que a plasmocitose foi maior em animais de baço TIPO3 do que nos animais com baço TIPO1 (Teste qui-quadrado, $P < 0,04$). A densidade de plasmócitos secretores de imunoglobulina do isotipo IgG foi maior na polpa vermelha de animais com baço TIPO3 (Teste Man-Whitney, $P < 0,05$). Em geral, observou-se uma tendência de maior densidade de plasmócitos secretores de imunoglobulinas dos isotipos IgM e IgG nos animais de baço TIPO3 em comparação com animais do baço TIPO1. Animais de baço TIPO3 apresentam maiores níveis séricos de proteína gamaglobulina e também uma maior expressão das citocinas BAFF e APRIL e da quimiocina CXCL12, que estão envolvidas no processo de ativação e *homing* de plasmócitos. No capítulo 4 foi visto que uma região de aproximadamente 1.28Mb do cromossomo 8 canino foi encontrada com os segmentos gênicos VH, DH e JH. As principais conclusões obtidas nesse estudo foram que a redistribuição de populações celulares do baço, especialmente de linfócitos B, células dendríticas foliculares e plasmócitos estão relacionada com a desorganização do tecido esplênico e com a expressão anômala de CXCL13, CXCL12, BAFF e APRIL, que são citocinas e quimiocinas envolvida com a organização do tecido esplênico, ativação e *homing* de plasmócitos. A ativação policlonal, a hipergamaglobulinemia e a diglobulinemia são também relacionadas com a desorganização do baço. As regiões variáveis (VH), diversidade (DH) e de junção (JH) da cadeia pesada de imunoglobulina são compostos de noventa e dois, dez e nove genes obtidos na linha germinativa canina, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: leishmaniose visceral canina, plasmocitose, ativação policlonal, baço, CXCL13, CXLC12, BAFF, APRIL, PCR em tempo real.

ABSTRACT

SILVA, Joselli Santos. Disruption of splenic white pulp in canine visceral leishmaniasis: cells and cytokines involved 183f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Criz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Monix, Salvador, 2014.

Visceral leishmaniasis is associated with splenic architectural changes and redistribution of cell populations involved in the immune response. The objectives of this thesis was to study the disruption of the white pulp of the spleen in canine visceral leishmaniasis and which cells and cytokines are involved in this process. For this, samples of spleens of dogs from an endemic area for VL were grouped into three categories: TYPE1-CONT or TYPE1-NIF (non-infected dogs or without active infection with organized white pulp), TYPE1-INF (infected dogs with pulp organized white) and TYPE3-INF (infected animals with disorganized white pulp). In Chapter 2 and 3 the spleens sections were stained by immunohistochemistry with anti-CD3 (T lymphocytes), anti-CD79 (B lymphocytes), anti-S100 (follicular dendritic cells), anti-Ki-67 (cells proliferation), anti-IgG and anti-IgM (plasma cells). The number and distribution of all cell populations were estimated by morphometry. The expressions of cytokines and chemokines were assessed by real time RT-PCR. The polyclonal B cell activation and hypergammaglobulinemia were evaluated by ELISA and serum protein electrophoresis. In chapter 2, it was seen that the density of B lymphocytes was higher in the marginal zone and follicles of animals with spleen TYPE1-INF than animals with the spleen TYPE3-INF (Mann -Whitney test $P < 0.02$). The numbers of proliferating cells, B cells and follicular dendritic cells was lower in animals of TYPE3-INF. The expression of the chemokine CXCL13 was higher in the spleen of animal with the spleen TYPE 1 (Mann-Whitney, $P < 0.02$). No difference was observed in the expression of other cytokines compared between the two groups of animals. In chapter 3, it was seen that the plasma cells was higher in animals with spleen TYPE 3 than in animals with spleen TYPE1 (Chi-square test, $P < 0.04$). The density of plasma cells secreting the isotype IgG was higher in the red pulp of spleen of animals TYPE3 (Man-Whitney test, $P < 0.05$). In general, there was a trend toward higher density of plasma cells secreting the immunoglobulin of isotype IgM and IgG in the spleen of animals with spleen TYPE3-INF in comparison to animal's spleen TYPE1. Animals with spleen TYPE3 have higher levels of serum gamma globulin protein as well as increased expression of cytokines, BAFF and APRIL and the chemokine CXCL12 that are involved in the activation and homing plasma cells. The main conclusions of this study were that the redistribution of cell populations of the spleen, especially B lymphocytes, follicular dendritic cells and plasma cells (characterized by intense plasmacytosis) are related to the disorganization of the splenic tissue and aberrant expression of CXCL13, CXCL12, BAFF and APRIL, which are cytokines and chemokines involved in the organization of the splenic tissue, activation of B cells and plasma cell homing. The polyclonal activation, hypergammaglobulinemia and diglobulinemia are also related to the structural disorganization of the splenic lymphoid tissue. In addition, it was concluded that the variable regions (VH), the diversity (DH) and junction (JH) immunoglobulin heavy chain are composed of ninety-two, ten and nine genes that have been obtained in canine germline.

KEYS WORDS: canine visceral leishmaniasis, plasmacytosis, polyclonal activation, spleen, CXCL13, CXLC12, BAFF, APRIL, real-time PCR.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral zoonótica está em expansão no Brasil (COSTA *et al.* 2002; DANTAS-TORRES 2006; MADEIRA *et al.* 2006), em outros países do Continente Americano (ENSERINK 2000; DUPREY *et al.* 2006) e no mundo (ALVAR *et al.* 2012). Sabe-se que no mundo ocorrem aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV a cada ano, sendo mais de 90% desses casos ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (ALVAR *et al.* 2012). No Brasil, cerca de 40.000 indivíduos foram acometidos por leishmaniose visceral entre os anos de 2000 e 2010 com uma letalidade de aproximadamente 6% (BRASIL, 2011).

De forma similar a humanos, cães infectados com *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) podem desenvolver um espectro de manifestações clínicas (MORENO *et al.* 2002). Tais semelhanças tornam o conhecimento da doença canina importante não só de ponto de vista veterinário e saúde pública, como também a faz um modelo para a leishmaniose visceral humana. Além disso, evidências suportam a idéia de que o cão é o principal reservatório urbano da *Leishmania infantum* (DESJEUX 1996; QUINNELL *et al.* 1997; ZERPA *et al.* 2000; QUINNELL *et al.* 2003; COSTA *et al.* 2007), por isso acredita-se que o desenvolvimento de ferramentas para controle de LV canina terá forte impacto sobre a redução da incidência de LV em humanos (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.* 2009).

O perfil de susceptibilidade à LV em cães é marcado pela presença de sinais clínicos de doença incluindo emagrecimento, anemia, leucopenia e alterações da resposta imune, favorecendo ao surgimento de infecções bacterianas. Adicionalmente, cães desenvolvem um intenso parasitismo cutâneo, incomum em seres humanos infectados com *L. infantum*. Uma das principais condições associadas ao óbito nas formas clínicas graves

da LV humana ou canina é o surgimento de infecções bacterianas (KADIVAR *et al.* 2000).

Os elementos que contribuem para a pobre resposta do hospedeiro a infecções bacterianas no curso da LV são pouco conhecidos. Possivelmente inclui a leucopenia com redução do número de neutrófilos, a ativação policlonal ineficaz da resposta imune humoral e a supressão da resposta celular efetora inata ou adquirida (DE LUNA *et al.* 1999).

Acreditamos que o conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença em cães é potencialmente útil para a escolha racional de reagentes candidatos ao uso como vacina ou terapêutica contra a leishmaniose visceral canina e para a melhor compreensão dos mecanismos da doença humana.

Em um estudo anterior do nosso grupo, observamos uma desestruturação do tecido linfóide esplênico em cães, associado com a presença de marcadores de susceptibilidade à leishmaniose visceral e enfermidade mais grave (SANTANA *et al.* 2008). Nesse mesmo estudo, foi observado que a frequência de plasmócito está aumentada nos baços dos cães naturalmente infectados com *Leishmania*.

Recentemente nós demonstramos que em animais com evidência de infecção por *Leishmania*, essa desorganização estrutural do baço está associada com frequência de sinais clínicos e laboratoriais mais graves da doença (LIMA *et al.* 2013). Em outro estudo ainda não publicado, vimos que *Streptococcus* e *Staphylococcus* são os principais microrganismos que infectam a pele e os olhos desses animais. Existe uma maior frequência de infecções bacterianas de pele em animais com culturas de baço positivas para *Leishmania* (9/19, 47%) do que em animais com culturas negativas (7/34, 21%) e a frequência de conjuntivite purulenta foi maior no grupo de animais com infecção por

Leishmania e desorganização do tecido linfóide esplênico que em animais com infecção por *Leishmania* com organização estrutural do tecido esplênico.

Dessa forma, nossa hipótese é de que essa desestruturação da polpa branca esplênica está associada com a redistribuição de populações celulares imunocompetentes do baço e conseqüentemente, à resposta ineficiente a infecções bacterianas e o estabelecimento de um status inflamatório, observados em estágios avançados da enfermidade.

Neste estudo, damos continuação ao trabalho desenvolvido na dissertação de mestrado visando a compreensão dos mecanismos de desestruturação histoarquitetural do baço no contexto da infecção por *Leishmania infantum*. Acreditamos que a desorganização linfóide esplênica leva a uma diferenciação anormal de linfócitos B resultando em uma plasmocitose importante que contribui para a progressão da leishmaniose visceral, favorecendo, dessa forma, o aparecimento de coinfeções. Buscamos então avaliar alterações na distribuição dessas células imunocompetentes do baço e a produção de citocinas potencialmente envolvidas nesse processo de diferenciação, *homing* e sobrevivência dessas células.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A LEISHMANIOSE VISCERAL

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma doença grave e sistêmica com taxa de letalidade atingindo até 6,0%. No Brasil, cerca de 40.000 indivíduos foram acometidos por leishmaniose visceral entre os anos de 2000 e 2010 (BRASIL, 2011). Na Figura 1 podemos ver os números de casos de LV no Brasil entre os anos de 1984 e 2010 (ALVAR *et al.* 2012).

A transmissão da leishmaniose ocorre pela picada de um inseto vetor fêmea (flebotomíneo) infectado. Em todo continente americano o principal vetor é a *Lutzomyia longipalpis* (DESJEUX 2001), enquanto na Europa, Ásia e África os transmissores pertencem ao gênero *Phlebotomus*, variando as espécies de uma região para outra (DESCOTEAUX *et al.* 1999).

Após serem injetadas na derme do hospedeiro, as formas promastigotas (flageladas) da *Leishmania* são englobadas por fagócitos mononucleares, onde se transformam em amastigotas (aflageladas) que irão se proliferar e infectar células vizinhas (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO 1995; DESCOTEAUX *et al.* 1999; ASHFORD 2000;) ou se estabelecem em órgãos internos como baço, fígado e medula óssea (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO 1995; FREITAS 2006).

Durante o desenvolvimento da LV, os parasitas *Leishmania donovani* ou *Leishmania infantum*, mais raramente outras espécies de *Leishmania* (BARRAL *et al.* 1986) invadem células do sistema fagocítico mononuclear de órgãos internos como fígado, baço, linfonodo e medula óssea (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO 1995; DESJEUX 1996; MAURICIO *et al.* 2000). Na Figura 2 podem ser observados aspectos histológicos de vários órgãos acometidos na LV.

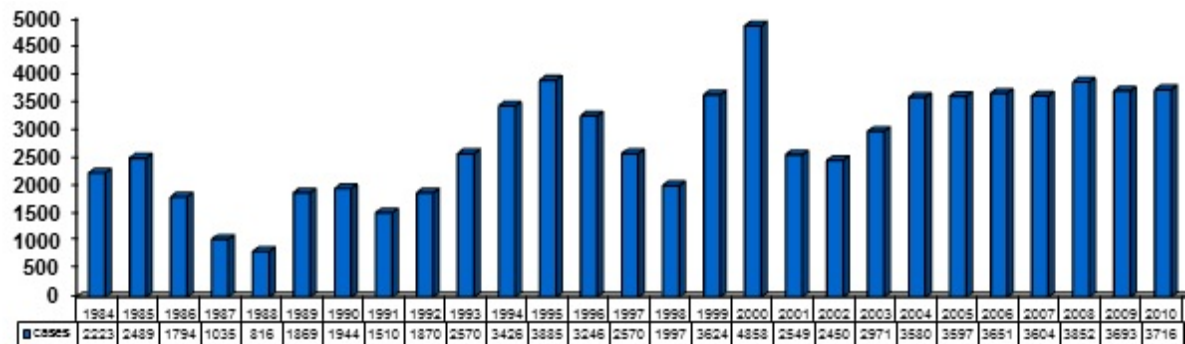


Figura 1. Gráfico mostrando o número de casos de Leishmaniose Visceral no Brasil nos últimos 26 anos (Supporting information, ALVAR *et al*, 2012).

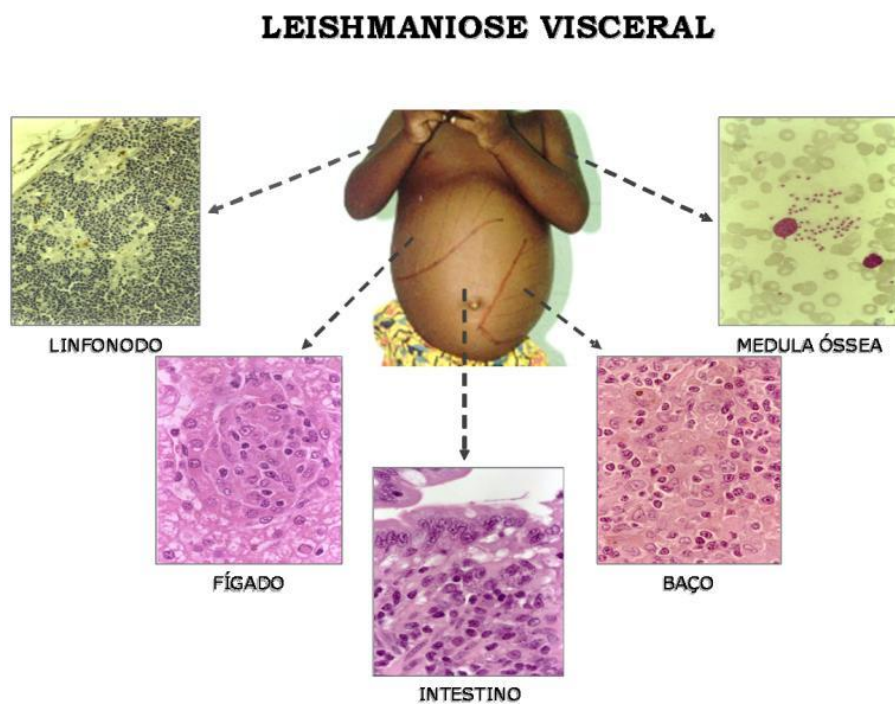


Figura 2. Representação dos aspectos histológicos de vários órgãos da leishmaniose visceral (HERMIDA *et al*, 2007).

Os padrões de disseminação da LV incluem as formas antroponótica ou zoonótica. A forma antroponótica, transmitida de humano para humano

é causada pela *Leishmania donovani*. A forma zoonótica, que inclui no ciclo de transmissão outros mamíferos como o cão, é causada pela *Leishmania infantum* (SILVEIRA *et al.* 1982; TRAVI *et al.* 1998).

Considerada uma doença endêmica em algumas regiões do mundo, contabilizando 0,2 a 0,4 milhões de casos a cada ano, a LV está presente em mais de 70 países, sendo mais de 90% dos casos globais ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Cerca de 90% dos casos de LV da América Latina acontecem no Brasil (BRASIL 2009).

Há alguns anos a LV era considerada uma doença predominantemente rural, porém com a migração da população para os centros urbanos tem ocorrido uma rápida urbanização dessa doença no Brasil (MARZOCHI *et al.* 1994; SILVA *et al.* 2001; COSTA 2008) e em muitos outros países da América do Sul (CHAPPUIS *et al.* 2007).

Condições favoráveis como a presença do inseto vetor nas cidades, pobreza, subnutrição, más condições sanitárias e o aumento da população de cães reservatórios junto à população, têm sido apontadas como importantes fatores demográficos e ecológicos desencadeadores da sua expansão (SILVA *et al.* 2001; CALDAS *et al.* 2002; CABRERA *et al.* 2003).

Após um período de incubação de 10 dias ou até 24 meses (BRASIL 2009), a LV pode apresentar uma evolução aguda, subaguda ou crônica, mas parte dos indivíduos infectados permanece completamente assintomática (BADARO, CARVALHO, *et al.* 1986; BITTENCOURT & BARRAL-NETTO 1995).

As manifestações clássicas da LV incluem febre, caquexia, hepatoesplenomegalia (hepatomegalia predominante), pancitopenia (com anemia, trombocitopenia e leucopenia, com neutropenia,

eosinopenia, e relativas linfocitose e monocitose) e hipergamaglobulinemia com ativação policlonal de células B com hipoalbuminemia (BADARO, JONES, *et al.* 1986; DAVIDSON 1999; HERWALDT 1999; OSMAN *et al.* 2000; COLLIN *et al.* 2004). Os sintomas podem persistir por semanas ou meses antes dos pacientes buscarem cuidados médicos ou morrerem por co-infecções bacterianas (por exemplo, pneumonia, diarreia ou tuberculose), hemorragia ou anemia grave (CHAPPUIS *et al.* 2007).

A LV tem também emergido como uma importante infecção oportunista em pacientes imunossuprimidos, incluindo pacientes com AIDS (ALVAR *et al.* 1997; DAVIDSON 1999; DESJEUX *et al.* 2003). Nessas condições de co-infecções que causam imunossupressão pode levar à progressão da LV para a forma clássica da enfermidade, já que a resposta imune celular efetiva ao parasita está comprometida (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO 1995).

As principais estratégias de controle da LV no Brasil estão centradas na identificação e eliminação dos reservatórios, principalmente o cão, aplicação de inseticidas para eliminação do inseto vetor e no diagnóstico e tratamento adequado dos casos registrados (ASHFORD 1996). Dentre essas medidas, o sacrifício de cães infectados soropositivos é a mais polêmica por questões éticas e limitada aceitação nas comunidades.

A eliminação flebotomíneo através do uso de inseticidas não é de fácil execução, devido a dificuldade de encontrar seus sítios de deposição o que limita a eliminação das formas jovens do inseto vetor (DANTAS-TORRES *et al.* 2006). No Brasil, o controle do vetor deve ser realizado frequentemente uma que vez que estudos demonstram a ocorrência do *Lutzomyia longipalpis* durante todos os meses do ano, o que contribui para a manutenção da transmissão da leishmaniose visceral, pelo seu contato constante com o cão infectado (FORATTINI *et al.* 1973; REBELO 2001; ARAUJO E SILVA *et al.* 2007; RANGEL *et al.* 2008). Em outros

países, como a Índia e diferentes regiões da Itália, a transmissão intensa de LV ocorre durante dois períodos do ano com picos influenciados por fatores climáticos (BETTINI *et al.* 1986; FERROGLIO *et al.* 2005; ROSSI *et al.* 2008; SHARMA *et al.* 2008).

O desenvolvimento de uma vacina para cães tem sido apontado como uma boa alternativa para prevenir a leishmaniose visceral (DYE 1996). Vários grupos de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de vacinas para a leishmaniose visceral humana ou canina (DAVIES *et al.* 2003; GRADONI 2001; REQUENA *et al.* 2004).

A vacinação experimental contra a leishmaniose tem evoluído a partir da prática de leishmanização com parasitas vivos à vacinação com lisados brutos, extratos de parasitas nativos além de vacinas recombinantes e de DNA. Mais de 30 vacinas têm sido estudadas em modelos laboratoriais, no entanto a formulação para humano não foi autorizada até agora, embora existam três vacinas caninas de segunda geração registradas (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.* 2009). É importante lembrar que para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a LVC, a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune canina a *Leishmania* é sem dúvidas imperativo (PINELLI *et al.* 1999).

2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

A LVC foi descrita pela primeira vez na Tunísia em 1908 por Nicole & Conte (ASHFORD *et al.* 1998) e, desde então, o cão tem sido considerado o principal reservatório da *L. infantum*, especialmente na China, bacia do Mediterrâneo e Américas (ENSERINK 2000; ZERPA *et al.* 2000; MORENO *et al.* 2002; STRAUSS-AYALI *et al.* 2007).

A soroprevalência de *L. infantum* em cães dos países Mediterrâneos tem variado entre 2-20%, atingindo picos de até 40% (BETTINI *et al.* 1986; MARTINEZ-MORENO *et al.* 1995). Em estudo realizado com uma

amostra de cães assintomáticos dessa região a soroprevalência foi de 66% (BERRAHAL *et al.* 1996). Na América de Sul, altas taxas de soroprevalência têm sido reportadas, especialmente em cidade endêmicas para LV da região nordeste do Brasil. O que se sabe é que a leishmaniose visceral ocorre em ondas periódicas em áreas endêmicas do Brasil (FRAGA *et al.*, 2012).

Estudos realizados em uma área endêmica para LV, a cidade de Jequié (Bahia-Brasil) demonstraram que 43% dos animais errantes coletados nas ruas eram sororreagentes (DOS-SANTOS *et al.* 2008) e uma incidência de infecção de 6,55 casos/100 cães-ano (PARANHOS-SILVA *et al.* 1998). Em estudo mais recente, Fraga e colaboradores (2012) observaram a prevalência da leishmaniose visceral humana e de infecção por *Leishmania infantum* em cães errantes nessa mesma área endêmica, entre 1997 e 2010. A prevalência de leishmaniose visceral humana teve dois picos (40 casos) em 1997 e 2006, com quedas acentuadas a dois casos em 2001 e para cinco casos em 2008. Flutuações semelhantes também foram observadas na ocorrência de cultura do baço positiva e sorologia anti-*Leishmania* em cães, embora a proporção de cães com parasitismo ativo do baço manteve-se relativamente alta, mesmo nos períodos de baixa prevalência da doença humana. Esses achados permitiram os autores concluir que cães errantes podem constituir uma fonte renovável de parasitas, capazes de sustentar a persistência da infecção em áreas urbanas, mesmo em períodos de baixa transmissão por flebotomíneos (FRAGA *et al.* 2012).

As conseqüências da LVC são altamente variáveis. Cães infectados podem desenvolver uma infecção polissintomática apresentando mais de três sinais comuns da doença, outros apresentam uma forma oligossintomática com dois a três sinais, e outros não desenvolvem a doença e permanecem assintomáticos (BARBIERI 2006; MANCIANTI *et al.* 1988; POZIO *et al.* 1981; REIS *et al.* 2006)

Após um período de incubação de 2 a 4 meses, cães com a doença progressiva desenvolvem manifestações clínicas clássicas como linfadenopatia, anemia, diarreia, alopecia, dermatite, onicogribose, perda de peso, caquexia, problemas de locomoção, ceratoconjutivite e epitaxia (CIARAMELLA *et al.* 1997; BARROUIN-MELO *et al.* 2006).

Outros sinais como hepatoesplenomegalia, apatia, hemorragia intestinal, hiperqueratose, infiltrados inflamatórios cutâneos além de ulcerações, particularmente em orelha e focinho são também freqüentes na LVC (GENARO *et al.* 1988; ANDRADE *et al.* 1989; ANDRADE *et al.* 1990; CIARAMELLA *et al.* 1997; DIAS *et al.* 1999; BARROUIN-MELO *et al.* 2006; DOS-SANTOS *et al.* 2004).

O diagnóstico de LVC geralmente é difícil uma vez que a variabilidade de sinais clínicos é grande decorrente do extraordinário pleomorfismo da doença que acaba por mimetizar outras doenças (DA COSTA *et al.* 1991; ROURA *et al.* 1999). Existem basicamente três categorias de testes usados para o diagnóstico de LVC: parasitológicos (detecção do parasito em esfregaços e imprints, e isolamento em cultura); imunológicos: métodos sorológicos (detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania*) e teste cutâneo da leishmanina (TCL) tem se mostrado capaz de detectar atividade imunológica celular no cão que resiste à LV (PINELLI *et al.* 1994; CARDOSO *et al.* 1998; BALEEIRO *et al.* 2006;; DOS-SANTOS *et al.* 2008) e métodos baseados em biologia molecular pela amplificação do DNA do parasita por PCR (SOLCA *et al.* 2012, REIS *et al.* 2013).

Sabe-se também que as associações entre parâmetros parasitológicos e imunológicos podem melhorar o desempenho destes na predição da susceptibilidade a LVC (DOS-SANTOS *et al.* 2008).

2.3 O BAÇO

2.3.1 ESTRUTURA E FUNÇÕES ESPLÊNICAS

O baço é o maior acúmulo linfóide do organismo e está localizado na parte esquerda da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma (MEBIUS *et al.* 2005). Como o único órgão linfóide interposto na circulação sanguínea, ele é o maior filtro de sangue do corpo (KRAAL 1992; STEINIGER *et al.* 2000) e o principal responsável pela eliminação de partículas e patógenos em suspensão no sangue.

Esse órgão é parenquimatoso e é envolvido por uma cápsula a partir da qual emergem trabéculas fibrosas para o seu interior (VAN ROOIJEN 1989). Por essas trabéculas caminham artérias que se dividem ao deixarem a cápsula, passam a ser chamadas de artérias centrais e são envolvidas por uma bainha de linfócitos (a maioria deles linfócitos T). A bainha de linfócitos por vezes se espessa formando nódulos ou folículos (JUNQUEIRA 1995)

O parênquima esplênico é subdividido em dois compartimentos chamados de polpa branca (KYAW *et al.* 2006) e polpa vermelha (PV) devido aos seus aspectos macroscópicos (na polpa branca tem sua aparência devido à presença de acúmulos compactos de leucócitos e a polpa vermelha devido à grande quantidade de eritrócitos) (CHAPLIN 2002).

A polpa vermelha é formada por cordões esplênicos, separados por sinusóides. Os cordões esplênicos, também chamados de cordões de Billroth, são contínuos e de espessura variável, conforme o estado local de distensão de sinusóides. São constituídos por uma rede frouxa de células reticulares e fibras reticulares de colágeno do tipo III, que contém outras células, como macrófagos, linfócitos T e B, plasmócitos, monócitos, granulócitos, megacariócitos (especialmente em cães e

camundongos), além de plaquetas e eritrócitos (VAN ROOIJEN *ET AL.* 1988, JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A polpa vermelha também é conhecida como o sítio onde plasmoblastos e plasmócitos se alojam. A posição dos plasmoblastos na PV se assemelha a localização de plasmoblastos nos cordões medulares dos linfonodos, e é responsável por uma produção de anticorpos extrafolicular que leva a uma rápida entrada de anticorpos na corrente sanguínea (HARGREAVES *et al.* 2001).

Funcionalmente, a PV está prioritariamente relacionada à filtração do sangue com remoção de eritrócitos velhos, reciclagem de ferro por fagocitose dos eritrócitos e além pela produção de anticorpos (devido à presença de plasmócitos) (MEBIUS *et al.* 2005). A polpa vermelha funciona também como via de saída para a maioria das células linfóides recirculantes. A presença de macrófagos nessa região favorece a fagocitose de antígenos presentes no sangue.

A polpa branca é composta pela (1) bainha periarteriolar rica em linfócitos T (PALS) que envolve a artéria central; (2) folículos linfóides (FOL) que são agregados predominantemente de linfócitos B, que surgem a partir da região periarteriolar e consistem de uma zona do manto e um centro germinativo; (3) a zona marginal (GRAYSON *et al.* 2003) que contorna a região periarteriolar e o folículo separando da polpa vermelha (VAN ROOIJEN 1989). A organização correta e a manutenção da polpa branca são controladas por quimiocinas específicas, que atraem células T e B para os seus respectivos domínios, estabelecendo assim zonas específicas dentro da polpa branca (MEBIUS *et al.* 2005).

A zona de células T (PALS) está relacionada com a ativação da resposta imune celular. As DCs maduras expressando antígenos ligados ao seu MHC migram da ZM para a PALS e apresentam os antígenos para os

linfócitos T favorecendo dessa forma o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Na área central da PALS encontram-se também células não linfóides interdigitantes (IDCs) que participam como células acessórias na resposta imune, na apresentação de antígenos (STEINMAN *et al.* 1980; KAMPERDIJK *et al.* 1985; BREEL *et al.* 1987). A inibição de IL 12, ou da expressão de receptores para quimiocinas reduz a migração de células dendríticas para o PALS e compromete a ativação dos linfócitos T nessa área (ENGWERDA *et al.* 2002; ATO *et al.* 2002).

O FOL tem um papel muito importante na resposta imune humoral. Após o contato com os antígenos na ZM, as células B migram para o interior do FOL aonde após alguns dias irão se proliferar (expansão clonal de células B), haverá a seleção de células B com receptores antigênicos de alta afinidade pelos antígenos, apoptose de células B auto-reativas e diferenciação de células B em células de memória (HARGREAVES *et al.* 2001). O folículo apresenta ainda células não linfóides capazes de reter complexo antígeno-anticorpo conhecidas como células dendríticas foliculares (FDCs) (KLAUS *ET AL.* 1980).

Durante as reações imunológicas, os folículos primários transformam-se em folículos secundários ativados. Os folículos secundários são formados pelo centro germinativo e pelo manto (ou coroa) e geralmente são maiores do que os folículos primários. O tráfico celular influencia na manutenção dos compartimentos esplênicos e no estabelecimento da resposta imune (BALOGH *et al.* 2004).

A ZM é uma importante área de transição de células que deixam a corrente sanguínea e entram no baço. Basicamente, o sangue que chega ao baço é distribuído através das arteríolas terminais e desembocam na ZM, onde os antígenos circulantes são capturados pelos macrófagos de zona marginal (MZM), macrófagos metalofílicos (MMM) e células dendríticas (AICHELE *et al.* 2003; MEBIUS *et al.* 2005).

As células B da zona marginal, sob estímulo antigênico, migram para outros compartimentos esplênicos onde ativam células TCD4+, e são também responsáveis pela proliferação e produção de anticorpos específicos (ATTANAVANICH *et al.* 2004). Dessa forma, a zona marginal favorece esse encontro entre o antígeno e células apresentadoras de antígeno, imprescindível para que haja ativação linfocitária e desenvolvimento da resposta imunológica específica. (ATTANAVANICH *et al.* 2004)

2.3.2 ORGANIZAÇÃO DOS COMPARTIMENTOS ESPLÊNICOS, DINÂMICA DA DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS E QUIMICINAS RESPONSÁVEIS PELA RESPOSTA IMUNE NO BAÇO

A organização e manutenção das polpas branca e vermelha esplênicas são controladas por quimiocinas específicas que atraem as células imunocompetentes para aos seus respectivos domínios (MEBIUS *et al.* 2005; MUELLER *et al.* 2008). Na Figura 3 pode ser observado um desenho esquemático dos compartimentos esplênicos mostrando as principais células e quimiocinas envolvidas.

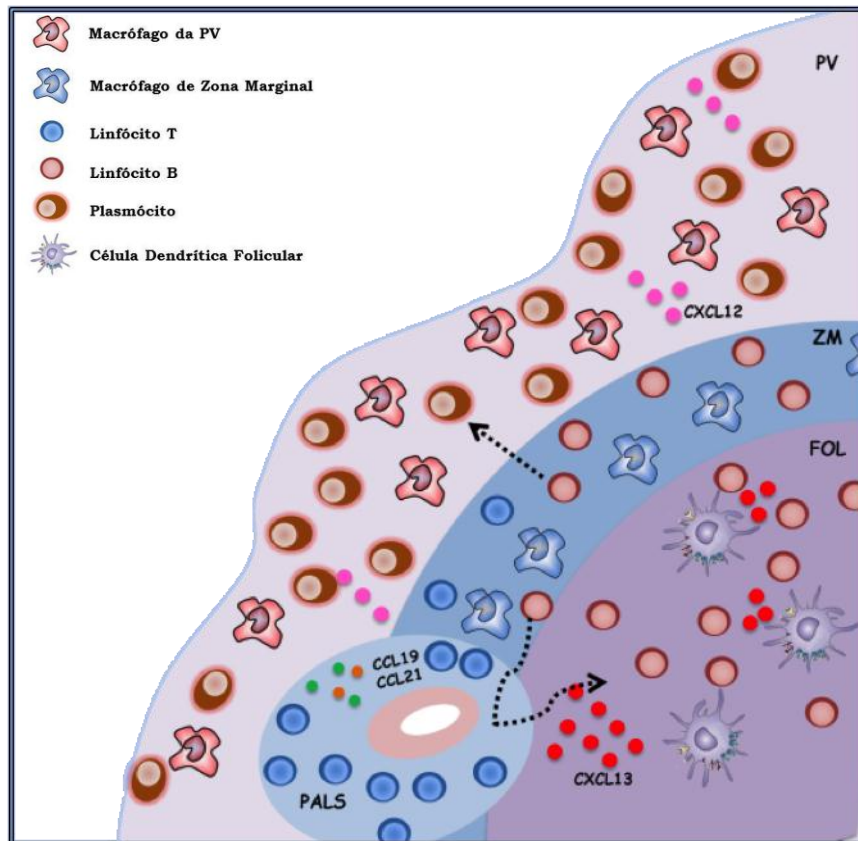


Figura 3. Desenho esquemático dos compartimentos do baço. Principais células e quimiocinas envolvidas na organização desses compartimentos.

A quimiocina CXCL13, produzida por FDCs e células estromais, é requerida para que células B migrem para o folículo (ANSEL *et al.* 2000; OHL *et al.* 2003). As quimiocinas CCL19 e CCL21 estão envolvidas na atração de células T e células dendríticas para as zonas de células T (PALS) (FORSTER *et al.* 1999; GUNN *et al.* 1999) e contribuem para a manutenção de macrófagos na zona marginal (ATO *et al.* 2004).

Estudos têm demonstrado que células B maduras aumentam a expressão de CXCR5 e adquirem a capacidade de responder a quimiocina CXCL13, produzida em folículos linfóides. Essas células B maduras também expressam CCR7, um receptor de quimiocina de zona T fazendo-as migrarem em direção às quimiocinas CCL19 e CCL21 (CYSTER 1999).

As expressões dessas quimiocinas são controladas por Linfotoxina- $\alpha 1\beta 2$ (LT $\alpha 1\beta 2$) e por fator de necrose tumoral (TNF). Foi demonstrado que a produção de LT $\alpha 1\beta 2$ tem um papel crítico na formação e manutenção da estrutura tecidual de órgãos linfóides secundários (FU *et al.* 1999).

Como já citado, células B expressam o receptor CCR5 que medeia sua migração para o folículo de células B. A sinalização através desse receptor induz a expressão de LT $\alpha 1\beta 2$, que por sua vez, induz a diferenciação de FDCs e a expressão de CXCL13 por um *feedback* positivo (MEBIUS *et al.* 2005).

Um mecanismo similar ocorre para a regulação da integridade da zona de células T (PALS). Células estromais da PALS produzem CCL19 e CCL21. Durante o desenvolvimento do compartimento estromal da zona de células T, células B expressando LT $\alpha 1\beta 2$ são requeridas para expressão de CCL21 (NGO *et al.* 2001).

As células residentes da ZM estão diretamente envolvidas no estabelecimento e manutenção da sua integridade, especialmente a população de células B de zona marginal (MZB). As células B que expressam LT $\alpha 1\beta 2$ podem se ligar a LT β R que é expresso por células estromais ou endoteliais presentes na ZM, levando a indução da expressão de quimiocinas (CXCL13, CCL19 e CCL21) que podem influenciar a retenção dos subtipos celulares nessa região (MEBIUS *et al.* 2005). Para a localização de células B na ZM, a sinalização através do receptor S1P₁ é requerida, uma vez que células B S1P₁-deficientes migraram para o folículo ao invés de permanecer na ZM (CINAMON *et al.* 2004).

No que se refere à manutenção e disposição de células na polpa vermelha, evidências indicam os plasmoblastos (células B precursoras dos plasmócitos) são atraídos para a polpa vermelha após o aumento da expressão do receptor de quimiocina CXCR4. Esse receptor se liga a

quimiocina CXCL12 que é expressa na polpa vermelha (HARGREAVES *et al.* 2001).

Diversos estudos têm demonstrado que células B maduras, imaturas e progenitoras expressam o receptor de quimiocina CXCR4 e seu ligante CXCL12 é altamente expresso por células estromais da medula óssea (BLEUL *et al.* 1996; D'APUZZO *et al.* 1997).

No entanto, Hargreaves e colaboradores (2001) demonstraram que plasmócitos também expressam CXCR4 e tem um aumento de capacidade de resposta a CXCL12, que interessantemente também é produzido pelas células estromais da polpa vermelha esplênica. Dessa forma sabe-se que essa interação CXCR4 e CXCL12 têm um papel muito importante na regulação de plasmócitos e seu posicionamento no baço. Além disso, esses autores também observaram que os plasmócitos presentes na polpa vermelha são responsáveis pela *downregulation* de receptores CXCR5 e CXCR7 reduzindo com isso a resposta a quimiocinas de zona B e T esplênicas, como CXCL13, CCL19 e CCL21.

Acredita-se então que células B se diferenciam em plasmócitos sob uma mudança coordenada na expressão de receptor de quimiocina e capacidade de responder a essas quimiocinas. Dessa forma, parece que a diminuição da resposta de CXCL13, CCL19 e CCL21 ajuda diretamente a localização de plasmócitos fora da zona de células B e T, enquanto a interação CXCR4/CXCL12 regula a sua localização na polpa vermelha esplênica além de alojamento na medula óssea.

Na resposta imune T-dependente no baço, sabe-se as células B que entram em contato com antígeno na região de células T (PALS). A diferenciação de células B para plasmócitos se inicia então e essas células se movem para fora da zona de células T. No baço elas se movem através da ZM e próximas a vasos e fibras colagenosas na PV. Mais tardiamente na resposta, elas vão para a medula óssea.

Plasmócitos sidos gerados a partir da ativação de células B no CG tem seu *homing* preferencial para medula óssea. A maioria dos plasmócitos presentes na PV, em condições normais, vai viver apenas poucos dias enquanto os plasmócitos que vão para a medula óssea vão viver por semanas ou meses mantendo os níveis séricos de anticorpos elevados após a exposição ao antígeno (BENNER *et al.* 1981, SLIFKA *et al.* 1998).

O que se sabe é que a capacidade de plasmócitos se tornarem plasmócitos de vida longa está ligada a sua habilidade de fazer o *homing* para os nichos de células estromais que produzem moléculas críticas (CXCL12) para a sobrevivência de plasmócitos (FAIRFAX *et al.* 2008).

Muitos fatores microambientais podem estar implicados para a sobrevivência de plasmócitos na medula óssea (CASSESE *et al.* 2003); O'CONNOR *et al.* 2004, MINGES WOLS *et al.* 2007) ou polpa vermelha (BENNER *et al.* 1981, SLIFKA *et al.* 1998, SHAPIRO-SHELEF *et al.* 2005).

Alguns estudos tem demonstrado a importância de IL-6 na manutenção da sobrevivência de plasmócitos *in vitro* (CASSESE *et al.* 2003; ROLDAN *et al.* 1991). Diversos autores descreveram que a redução de fatores de ativação de células B pertencente à família TNF (BAFF) e/ou APRIL leva a uma diminuição dos plasmócitos de vida longa (INGOLD *et al.* 2005, O'CONNOR *et al.* 2004, RAMANUJAM *et al.* 2006).

Kalled e colaboradores (2005) descreveram BAFF como uma citocina responsável pela sobrevivência de células B, que tem sido amplamente usada na investigação da compreensão da maturação de célula B e na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de patologias de células B. APRIL é um “parente próximo” do BAFF e o qual seus papéis biológicos são menos compreendidos, podendo ter funções imunes e não-imunes (KALLED *et al.* 2005).

Logo, essas citocinas da superfamília TNF, BAFF e APRIL, são conhecidas por serem cruciais na sobrevivência, maturação e diferenciação de células B (KALLED 2005, MACKAY *et al.* 2003). A superexpressão de BAFF em animais transgênicos leva a um fenótipo de doença autoimune lúpica caracterizada pela hipergamaglobulinemia e altos níveis de anticorpos (KHARE ET AL, 2000). Chu e colaboradores (2009) mostraram que a ativação de células B leva a uma alta expressão de BAFF e APRIL em plasmócitos que pode levar a uma alça autócrina de auto sustentação que prolonga a sobrevivência de plasmócitos na medula óssea. (CHU *et al.* 2009). Esses autores demonstraram uma forte expressão dessas duas citocinas em células B e plasmócitos de pacientes com Lupus em alta atividade da doença, provendo uma fonte local constante desses fatores de crescimento para essas células.

Wols e colaboradores (2007) compararam a habilidade de células estromais do baço e da medula óssea para dar suporte à sobrevivência de plasmócitos de vida longa. Os estudos deles concluíram que a sobrevivência dos plasmócitos não é pré-programada, mas é fortemente manipulada pelo ambiente estromal. Em condições normais, as células estromais da medula expressam mais CXCL12 do que as células estromais do baço ou LN, e uma fator que contribui para isso é o fato de células estromais da medula óssea produzem IL6 (conhecido como fator derivado de células estromais) que influencia na sobrevivência (MINGES WOLS *et al.* 2007).

Investigações mais profundas são necessárias para definir a base da propensão de alguns plasmócitos permanecerem em órgãos linfóides secundários versus a propensão de outras de migrarem para a medula óssea.

2.3.3 ALTERAÇÕES DO BAÇO EM DOENÇAS

Por ser um órgão altamente organizado, o baço possui uma rede estrutural adequada para geração de uma resposta imune eficiente. A manutenção da integridade desse órgão é fundamental para defesa contra microorganismos (NASSIF *et al.* 2004).

A ausência do baço está associada a uma maior susceptibilidade a disseminação de infecções por bactérias encapsuladas e com aumento da mortalidade decorrente dessa infecção (ANDRADE *et al.* 1989; ANDRADE *et al.* 1990; HANSEN *et al.* 2001; KYAW *et al.* 2006). A esplenectomia já foi usada algumas vezes em tratamento de LV severa humana e experimental (REES *et al.* 1984; MAIOLI *et al.* 2007).

Crianças com a forma hepato-esplênica da esquistossomose apresentam uma redução na produção de espécies reativas de oxigênio (BRANDT *ET AL.* 2005) e adultos esplenectomizados tiveram uma mudança no perfil de células T CD4+ naive (KARAKANTZA *et al.* 2004). Em paciente com AIDS há uma destruição progressiva de FDCs e concomitante perda de centro germinativo (FOX *et al.* 1992).

Alterações arquiteturais da polpa branca esplênica têm sido descrita em modelos experimentais murinos de infecções com vírus (BENEDICT *et al.* 2006). A migração de macrófagos de zona marginal (MZM) para a polpa vermelha e de células B de zona marginal para o folículo foi observada como resposta a infecção experimental com *Staphylococcus aureus* (KARLSSON *et al.* 2003).

Em um modelo murino de infecção com malária foi visto o aumento de proliferação celular e desorganização na polpa branca, vacuolização das células esplênicas e um grande número de células apoptóticas (DKHIL 2009).

Achados como esplenomegalia com acentuada hiperplasia de polpa branca, espessamento de cordões esplênicos e moderada expansão de região de célula T (PALS) foram observados em um modelo de erlichiose monocítica canina. Houve também um aumento da expressão de células produtoras de IgG nos cordões esplênicos e na zona marginal dos animais infectados em relação aos animais do grupo controle (DE CASTRO *et al.* 2004).

2.3.4 ALTERAÇÕES DO BAÇO NA LEISHMANIOSE VISCERAL

O baço possui um papel central na LV, uma vez que está infectado em todos os casos da doença e mantém essa infecção durante todo o seu curso (CARRION *et al.* 2006; WILSON *et al.* 1996). Além disso, esse órgão é de grande importância, pois é um sítio de interação entre o sistema imune e a *Leishmania*, vez que é onde os principais elementos da resposta imune aos parasitas se encontram em grandes quantidades. Entre estes elementos estão os antígenos circulantes (amastigotas de *Leishmania*), células apresentadoras de antígenos tais como as células dendríticas e células respondedoras a esses antígenos, como os linfócitos B e T.

É possível que muitas decisões imunológicas descritas na leishmaniose ocorram no baço, favorecidas pela sua localização, microarquitetura altamente organizada e pela sua diversidade celular (BALOGH *et al.* 2004; MEBIUS AND KRAAL 2005). Alterações significativas dos ambientes imunológicos esplênicos têm sido associadas às infecções por *Leishmania* envolvendo cães, roedores e o homem (BENEDICT *et al.* 2006; CORREA *et al.* 2007; ENGWERDA *et al.* 2002; VERESS *et al.* 1977).

Aspectos histológicos do baço e linfonodos foram analisados em vinte casos fatais de leishmaniose visceral humana do Sudão. Eles

observaram atrofia da polpa branca do baço, associada com necrose e fibrose da área timo-dependente, o acúmulo de histiócitos contendo parasita e hiperplasia de plasmócitos (VERESS *et al.* 1977).

Diversos estudos utilizando modelo murino de leishmaniose visceral mostraram que a infecção por *Leishmania* faz com que a perda de populações de celulares do baço prejudique a migração celular para a zona marginal e folículos linfóides, o que em conjunto perturba a estrutura do órgão (SMELT *et al.* 1997; ATO *et al.* 2002; ENGWERDA *et al.* 2002). A perda de células imunocompetentes e as ações de citocinas, tais como TNF e IL-10 parecem ser os principais fatores envolvidos neste processo (MELBY *et al.* 2001; ENGWERDA *et al.*, 2002; ATO *et al.*, 2002; CARRION *et al.* 2006). Como já revisado, outras moléculas, tais como o quimiocinas e citocinas da família das linfotoxinas, são também envolvidas na organização e manutenção da estrutura do baço (ANSEL *et al.* 2000; CINAMON *et al.* 2004; ATO *et al.* 2006).

A perda progressiva de FDCs foi associada com infiltração de macrófagos fortemente parasitados no centro germinativo folicular em estágio avançado de LV em BALB/c (SMELT *et al.* 1997).

Ato e colaboradores (2002) demonstraram que DCs de camundongos com infecção crônica por *L. donovani* falharam em migrar da zona marginal para a PALS devido à expressão reduzida de CCR7 na superfície dessas células. Essa falha na migração de DCs foi atribuída ao aumento na produção de TNF- α , que aumentou a produção de IL-10 e por sua vez inibiu a expressão de CCR7 na superfície das DCs (ATO *et al.* 2002).

Mecanismos TNF- α dependentes parecem também estar envolvidos na perda de células estromais gp38+ da PALS e diminuindo a produção de CCL19 e CCL21 no baço desses animais. Camundongos deficientes para produção de CCL19 e CCL21 infectados com *L. donovani* apresentaram

perda seletiva de MZM e falha na migração de DCs da ZM para a PALS (ATO *et al.* 2006; ATO *et al.* 2004; ATO *et al.* 2002).

No mesmo modelo de infecção, foi observada a perda de MZM sob influência da ação de TNF- α que resultou em restrições na migração de linfócitos na polpa branca desses animais (ENGWERDA *et al.* 2002). Foi observada também uma alta produção de TNF- α por MZM, três dias após a infecção com *L. donovani* (GORAK *et al.* 1998).

Na leishmaniose visceral canina, as alterações esplênicas também estão presentes no curso da infecção natural por *L. infantum* em cães e elas possivelmente refletem o perfil de susceptibilidade desses cães para a LV (SANTANA *et al.* 2008).

Além de alterações macroscópicas comuns como a esplenomegalia, foi observado em animais sintomáticos um aumento de parasitas amastigotas no baço, especialmente dispersos na polpa vermelha ou adjacentes a cápsula (TRYPHONAS *et al.* 1977; KEENAN *et al.* 1984; TAFURI *et al.* 1996; REIS *et al.* 2006; SANCHEZ *et al.* 2004).

Recentemente foi descrito que na LVC há uma forte relação entre altas taxas de parasitismo esplênico com a diminuição do número absoluto de monócitos circulantes assim como também com mudanças fenotípicas nessa população celular (GUERRA *et al.* 2009).

O aumento de plasmócitos em órgãos linfóides é um achado comum na LVC. Corbeil e colaboradores (1976) observaram muitos plasmócitos na PALS e dispersos na polpa vermelha do baço de cães infectados (CORBEIL *et al.* 1976). Foi descrito também por Martinez-Moreno e colaboradores (1995) um aumento significativo na porcentagem de plasmócitos esplênicos em animais infectados (MARTINEZ-MORENO *et al.* 1995).

Em cães com LV, o baço pode apresentar folículos hiperplasiados e hialinose (TRYPHONAS *et al.* 1977), depósito de substâncias amilóides em polpa branca e polpa vermelha (CORBEIL *et al.* 1976) e atrofia folicular (TAFURI *et al.* 1996). Tafuri e colaboradores descreveram em 1996 e 2001 a presença de espessamento capsular com reação inflamatória difusa nos baços de cães com LV (TAFURI *et al.* 1996; TAFURI *et al.* 2001).

Alguns estudos foram realizados analisando o perfil de citocinas em baços de cães naturalmente infectados com *Leishmania*. Os níveis de IL-10, IL-4, IL-12, IL-10, IFN- γ e TNF- α foram analisados semi-quantitativamente por RT-PCR convencional em baços de cães infectados de Belo Horizonte. O aumento das expressões de IL-10 e IFN- γ foi visto em associação com aumento da carga parasitária dos animais e a progressão da doença (LAGE *et al.* 2007).

As produções de TNF- α e IL-6 foram avaliadas por ELISA em cães infectados com *L. infantum* de Araçatuba (São Paulo-Brasil). Não foram observadas diferenças na produção de TNF- α e a produção de IL-6 foi maior em cães com LV ativa quando comparados com saudáveis (DE LIMA *et al.* 2007).

O aumento de expressão de IFN-gama foi visto em cão com LV adquiridas naturalmente e experimentalmente, sugerindo um predomínio de resposta imune do tipo Th1 durante a LVC (STRAUSS-AYALI *et al.* 2007).

Em um estudo recente, investigou-se a relação entre os níveis de expressão de determinadas quimiocinas e receptores de quimiocinas (em baço e fígado) e o estado clínico de cães com leishmaniose visceral. Nesse estudo, vinte e um cães foram clinicamente avaliados e classificados como assintomáticos (n = 11) ou sintomática (n = 10). Esplenomegalia, perda de peso e onicogrifose foram os sintomas mais

pronunciados. No baço, os níveis de expressão CCL1, CCL3, CCL17, CCL20, CCL26, CXCL9, CCR3, CCR4, CCR6 e CCR8 foram reduzidos em cães sintomáticos e assintomáticos em relação aos níveis de expressão em animais não infectados. Esses autores concluíram que cães sintomáticos têm menor nível de expressão de quimiocinas e receptores de quimiocina relativo a animais assintomáticos ou não infectados. A diminuição da migração de células favoreceria a replicação e disseminação do parasita, desencadeando os sintomas típicos da LVC (NASCIMENTO *et al.* 2013).

Santana e colaboradores (2008) examinaram 72 cães de rua de uma área endêmica para leishmaniose visceral, Jequié (BA-Brasil), com diferentes perfis de resposta à infecção com *Leishmania* e mostraram a ocorrência de desorganização do tecido linfóide (14/25, $P < 0,0001$), maior ocorrência de periesplenite (18/25, $P = 0,0001$), existência de granulomas (7/28, $P = 0,0102$), aumento da frequência de plasmócitos na polpa vermelha, presença de amastigotas de *Leishmania* em área subcapsular e polpa vermelha. Observou-se também uma redução na quantidade e tamanho dos folículos linfóides (20/25, $P = 0,0036$), além de uma redução de centros germinativos e zona marginal (15/25, $P = 0,0025$), nos baços desses cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados. Tais alterações esplênicas parecem estar relacionadas com a susceptibilidade dos cães para a leishmaniose visceral (SANTANA *et al.* 2008).

Dados clínicos e laboratoriais de 206 cães dessa mesma área endêmica para LV recolhidos entre 2004 e 2010 foram revisados. As secções de baço dos cães foram analisadas e classificadas, seguindo os parâmetros definidos previamente por Santana e colaboradores (2008): baço bem organizado, quando se distingue a bainha periarteriolar de linfócitos, centro germinativo, zona do manto e a zona marginal (baço tipo 1), ligeiramente desorganizado, quando a polpa branca está evidente, mas suas regiões são pobremente individualizadas e distintas (baço tipo 2); ,

ou extensivamente desorganizado quando a estrutura folicular está raramente distinta da polpa vermelha e área de células T (baço tipo 3). De 199 cães infectados com *Leishmania infantum*, 54 (27%) tinham baço tipo 1; 99 (50 %) baço tipo 2, e 46 (23 %) baço do tipo 3. O número de sinais clínicos associados com a leishmaniose visceral foi maior nos animais infectados com baço tipo 3 (mediana = 3, $P < 0,001$) ou tipo 2 (mediana = 3, $P < 0,01$) do que nos animais com baço tipo 1 (mediana = 2). Dentre os sinais clínicos, alopecia ($P < 0,01$), anemia ($P < 0,05$), a desidratação ($P < 0,05$), dermatite ($P < 0,05$), linfadenopatia ($P < 0,001$) e onicogribose ($P < 0,01$) foram mais frequentes entre os cães infectados com baço tipo 3 do que entre os cães infectados baço tipo 1 (LIMA *et al*, 2013).

A associação entre a gravidade da leishmaniose visceral canina e a desorganização do tecido linfóide do baço é ainda mais evidente no grupo de animais com a cultura do baço positiva. Outros sinais clínicos como conjuntivite e úlcera também foram mais freqüentes nos animais com baço tipo 3 do que nos animais com baço tipo 1. Os níveis séricos de albumina e creatinina foram menores e os níveis séricos de AST foram maiores em animais com baço tipo 3 do que nos animais com baço tipo 1. Esses achados demonstraram claramente que a desestruturação do tecido linfóide esplênico está associado com a apresentação clínica mais grave da leishmaniose visceral canina (LIMA *et al*, 2013).

Acredita-se que o perfil de susceptibilidade à LV em cães é marcado pela presença desses sinais clínicos de doença favorecendo ao surgimento de infecções bacterianas. Sabemos que uma das principais condições associadas ao óbito nas formas clínicas graves da LV humana ou canina é o surgimento de infecções bacterianas (KADIVAR *et al*. 2000).

Em achados recentes do nosso grupo ainda não publicados *Streptococcus* e *Staphylococcus* são os principais microrganismos que infectam a pele e os olhos de cães capturados na área endêmica de Jequié. Existe uma maior frequência de infecções bacterianas de pele em animais com culturas de baço positivas para *Leishmania* (9/19, 47%) do que em animais com culturas negativas (7/34, 21%) e a frequência de conjuntivite purulenta foi maior no grupo de animais com infecção por *Leishmania* e desorganização do tecido linfóide esplênico que em animais com infecção por *Leishmania* com organização estrutural do tecido esplênico (dado não publicado).

Esses achados juntamente contribuem para consolidação da idéia de que alterações importantes no tecido linfóide esplênico, comprometendo a capacidade de geração de folículos linfóides secundários, de manutenção da zona marginal, a substituição da celularidade normal do baço (perda de populações celulares imunocompetentes) por acúmulos de plasmócitos pode comprometer a capacidade de o baço atuar como órgão de vigilância contra infecções sistêmicas ou localizadas particularmente contra infecções bacterianas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as alterações imunoarquiteturais do baço e o perfil de expressão de citocinas envolvidas na desestruturação da polpa branca esplênica associadas a formas graves da leishmaniose visceral canina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar a distribuição de populações celulares no baço de cães com e sem desestruturação da polpa branca associada a leishmaniose visceral;

3.2.2 Estimar morfometricamente as populações de linfócitos B e T, células dendríticas e plasmócitos do baço de cães com infecção natural por *L. infantum* e desestruturação da polpa branca esplênica;

3.2.3 Examinar a expressão de citocinas potencialmente relacionadas com a manutenção da estrutura da polpa branca esplênica em cães com infecção natural por *L. infantum* e desestruturação da polpa branca esplênica;

3.2.4 Comparar a presença de ativação policlonal de linfócitos B e hipergamaglobulinemia em cães com infecção natural por *L. infantum* com e sem desestruturação da polpa branca esplênica;

CAPÍTULO 2

EXPRESSÃO ANÔMALA DA
QUIMIOCINA CXCL13
ASSOCIADA COM A
REDISTRIBUIÇÃO DE
POPULAÇÕES CELULARES DO
BAÇO NA LVC

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de desestruturação esplênica no contexto de infecção tem sido frequentemente associada com uma redistribuição, perda ou substituição de populações de leucócitos normalmente atuantes na resposta imune do hospedeiro ao parasita e a outros antígenos capturados no baço (ATO *et al.* 2004; CARRION *et al.* 2006; MELBY *et al.* 2001; SMELT *et al.* 1997).

Nesse contexto, diversos estudos experimentais realçam o papel de citocinas e quimiocinas na manutenção de compartimentos esplênicos (ENGWERDA *et al.* 2002; ATO *et al.* 2006; ATO *et al.* 2004). No entanto, sabemos que o modelo experimental da leishmaniose visceral em reflete apenas parcialmente, as características da infecção natural em animais susceptíveis como cães e seres humanos.

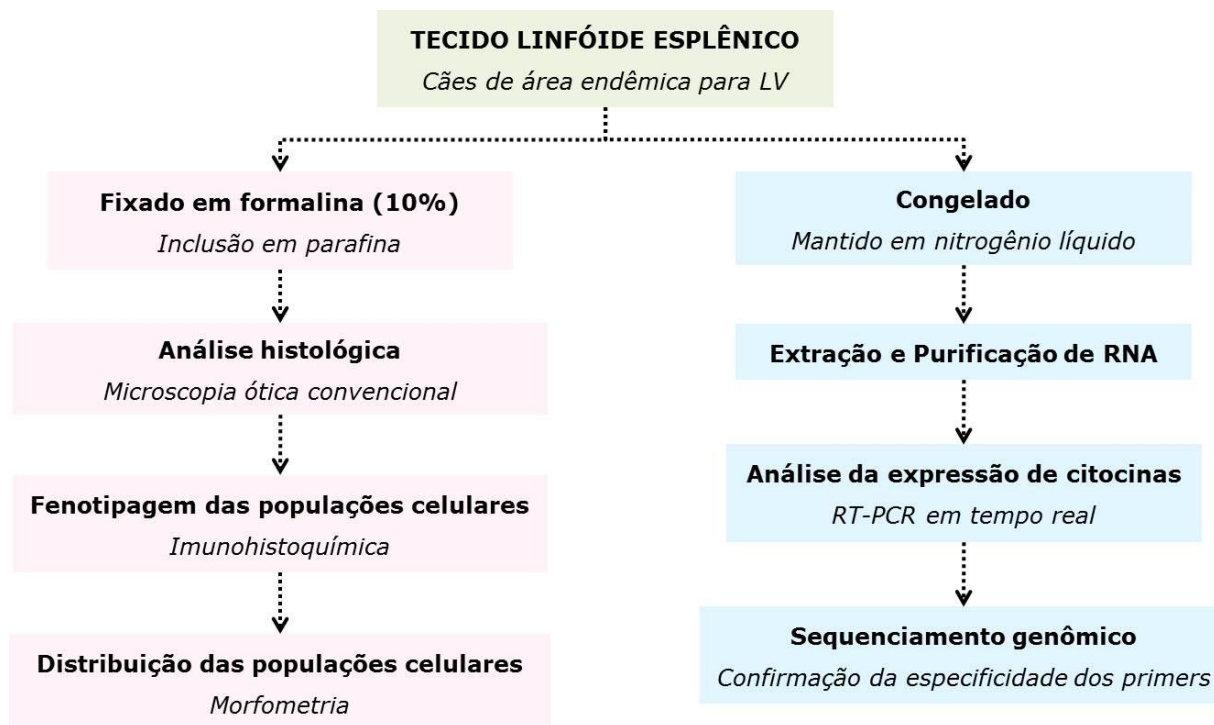
Nosso grupo tem contribuído com esses estudos examinando cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Demonstramos que a atrofia e desestruturação do tecido linfóide esplênico estão associadas a marcadores de susceptibilidade à leishmaniose visceral (SANTANA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2013).

O principal objetivo desse estudo foi definir as populações celulares e quimiocinas relacionadas a esse processo de desestruturação do tecido linfóide do baço na leishmaniose visceral canina naturalmente adquirida. Para isso utilizamos imunistoquímica na identificação de populações celulares no baço (células B, células T, células dendríticas foliculares e células em proliferação). O exame do perfil de expressão de citocinas, relacionadas à definição e manutenção da arquitetura do tecido linfóide do baço (CXCL13, TNF, TGF, IFN, IL10, CCL19, CCL21, CCR7, linfotoxinas alfa e beta) foi feito utilizando RT-PCR em tempo real.

Esse trabalho foi em parte desenvolvido durante o mestrado com a avaliação das distribuições de linfócitos B, T e células em proliferação além da análise da expressão de parte das citocinas previamente citadas. Posteriormente, o trabalho foi significativamente ampliado e refinado, incluindo-se a análise da distribuição da população de células dendríticas foliculares além da avaliação da expressão de outras citocinas, como a linfotóxina-beta, que estão envolvidas diretamente na organização de tecido linfoide. A partir desse trabalho foi gerada uma publicação que consta no capítulo 7 dessa tese.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DESENHO EXPERIMENTAL



2.2 DETALHAMENTO DA METODOLOGIA

2.2.1 ANIMAIS

Este é um estudo retrospectivo baseado em espécimes histológicos e registros experimentais arquivados no Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ (Bahia, Brasil). Os espécimes histológicos representam fragmentos de baço obtidos de 25 cães que foram coletados nas ruas de Jequié (Bahia, Brasil, uma área endêmica para LV) no período de 2004 a 2008, em colaboração com o Programa de Vigilância de Doenças Endêmicas do Serviço de Saúde do Estado da Bahia. Todos os animais foram

examinados clinicamente por pelo menos dois médicos veterinários utilizando fichas clínicas, avaliando os seguintes parâmetros: sexo, emagrecimento, anemia, dermatite, alopecia, conjuntivite, onicogribose, aumento de tamanho dos linfonodos, esplenomegalia e apatia.

Os animais foram agrupados nas seguintes categorias de acordo com os sinais clínicos relatados sugestivos de leishmaniose visceral: assintomáticos (sem sinais clínicos), oligossintomáticos (não mais de três sinais clínicos) e polissintomática (com mais de três sinais clínicos).

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro foi determinada por ELISA e a resposta imune celular contra antígenos de *L. infantum* foi detectada pelo teste cutâneo de leishmanina (TCL). Imediatamente após a eutanásia, aspirados de baço foram coletados para a cultura e fragmentos do baço foram coletados e congelados em nitrogênio líquido para os estudos de biologia molecular ou foram fixados em formol e incluídos em parafina para estudos morfológicos.

Para a determinação da expressão das citocinas no baço de animais não infectados (ELISA, TCL e PCR negativos para a infecção por *Leishmania*) com estrutura baço organizada, foram utilizados seis animais recolhidos das ruas de Jequié, no mesmo período e as condições descritas acima.

Detalhes sobre a realização do TCL e do ELISA foram publicados, previamente, por nosso grupo (BALEEIRO *et al.* 2006; DOS-SANTOS *et al.* 2008; PARANHOS-SILVA *et al.* 1998), descritos brevemente a seguir:

Preparo dos antígenos solúvel e bruto

Para as realizações dos testes ELISA e TCL foram previamente produzidos antígenos solúvel e bruto, respectivamente. Para isso, foram utilizadas promastigotas de *L. infantum* (cepas MHOM /BR2000

/Merivaldo² ou JPC) em fase estacionária de cultivo *in vitro*, em meio de Schneider (Gibco) contendo 10% de soro bovino fetal (Cultlab).

No preparo de antígeno bruto, os parasitos foram lavados três vezes com PBS e lizadas por ciclos repetidos de congelamento e descongelamento seguido por sonicação. Lotes de antígenos para ser usado em ELISA foram processados na presença de uma combinação de inibidores enzimáticos: 2 µg/mL de fluoreto de phenylmethanesulfonyl (PMSF), 2 µg/mL de N-p-tosyl-L-phenylalanine clorometilcetona (TPCK), 2 µg/mL de N-alfa-p-tosyl-L-lisina-clorometilcetona (TLCK), 2 µg/mL de 4-nitrofenil-p-O-guanidinobenzoate (NPGB) e 2 µg/mL de N-(trans-epoxysuccinyl)-L-leucina-4-guanidinobutylamide; trans-3-carboxyoxirane-2-carbonylL-leucylagmatine; trans-epoxysuccinylL-leucylamido (4-gunidino) butano; L-trans-3carboxyoxiran-2-carbonylL-leucylagmatine (E64) e centrifugados a 3000 g para remoção de material não solúvel. A eficiência do processo de lise dos parasitos foi testada visualmente, ao microscópio e a ausência de parasitos viáveis através do cultivo em meio bifásico (NNN-Schneider) de uma alíquota do antígeno a ser utilizado no TCL. As suspensões de antígenos foram armazenadas a -70 °C até à utilização.

Teste cutâneo da leishmanina

Antígeno de *L. infantum* foi diluído em solução salina a uma concentração final de 2,5 mg de proteína por µL. Cada animal foi injetado por via intradérmica com 100 µL de volume da solução antígeno em diferentes locais da pele abdominal. Como controle, 100 µL do diluente (solução salina) foram injetados em um local simétrico da pele abdominal. Quarenta e oito horas após as injeções, os tamanhos das indurações foram medidos por observadores sem o conhecimento prévio do local das injeções. As leituras foram realizadas auxiliadas pelo uso de uma caneta esferográfica e uma fita adesiva. A fita adesiva com a marcação da área medida foi sempre tomada e preservada no livro experimental, para eventual confirmação, se necessário. Os resultados são expressos como a média dos dois maiores

eixos transversais da área de induração. As reações da pele com tamanho de endurecimento igual ou maior que 5 mm foram considerados positivos.

ELISA para detecção de anticorpos anti-Leishmania sp

Antígeno de SLA (antígeno solúvel de *Leishmania*) de *L. infantum* foi distribuído na concentração de 3,125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ diluído em tampão carbonato (0,06 M, pH 9,6) em um volume de 100 μL em poços de placas 96 poços de microtitulação de fundo chato (Cliniplate-Labsystem). Essa concentração de antígeno foi escolhida a partir de ensaios preliminares usando soros de cães naturalmente infectados. Para o bloqueio das reações inespecíficas foi utilizada solução de PBS-0,05% Tween 20 (PBST) e 4mg/mL de albumina bovina sérica (BSA) por 1h a 37°C. Após três lavagens com PBST, 100 μL das amostras de soros caninos, diluídas de 1:800 em PBST contendo BSA (4mg/mL), foram incubadas por 1 h a 37°C. As placas foram lavadas com PBST três vezes, e, em seguida, incubadas com solução de anticorpo conjugado [Peroxidase AffiniPure Rabbit Anti-Dog IgG (H+L), Jackson Immunoresearch] na diluição de 1:10.000 por 1 hora a 37°C. A reação foi revelada no escuro com 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB - Sigma Aldrich) na presença do substrato peróxido de hidrogênio a 30% (H_2O_2) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Por fim, a reação foi parada com a adição de H_2SO_4 na concentração de 4M. A densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 450nm no espectrofotômetro (SpectraMax 340PC, Molecular Devices). A reação foi realizada conforme descrito por Dos-Santos e colaboradores (1996). Todas as amostras foram feitas em duplicata. O ponto de corte foi calculado para cada placa pela média dos valores de absorbância (D.O.) + 2 desvios padrão (DP) do resultado de ELISA utilizando soros de cães de áreas endêmicas e não endêmicas (controle negativo).

2.2.2 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com a Lei Federal Brasileira de Experimentação Animal (Lei 11.794

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20072010/2008/lei/111794.htm), com as diretrizes da Fundação Oswaldo Cruz para pesquisa com animais (<http://sistemas.cpqam.fiocruz.br/ceua/hiceuaw000.aspx>) e com o manual para a vigilância e controle da leishmaniose visceral. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética comissão para a utilização de animais em pesquisa (CPqGM-FIOCRUZ. Ceua, licença N.040/2005).

2.2.3 AMOSTRAS DE BAÇO E ANÁLISES HISTOLÓGICAS

As secções de tecido esplênico incluído em parafina foram cortadas com a espessura de 4,0 µm e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análise sob microscopia óptica convencional, para seleção dos animais para a constituição dos grupos experimentais. Para isso, os espécimes foram classificados quanto à organização da polpa branca utilizando os critérios definidos por Santana e colaboradores (SANTANA *et al.* 2008): *bem organizado*, quando se distingue a bainha periarteriolar de linfócitos, centro germinativo, zona do manto e a zona marginal (baço TIPO1); *discretamente desorganizado*, que apresenta mudanças hipoplásicas e hiperplásicas levando a uma perda de definição de algumas regiões da polpa branca (baço TIPO2); *moderadamente desorganizado*, quando a polpa branca está evidente, mas suas regiões são pobremente individualizadas e distintas ou *extensivamente desorganizado*, quando a estrutura folicular está raramente distinta da polpa vermelha e área de células T (baço TIPO3). A Figura 4 mostra aspectos histológicos representativos dessas categorias de organização do tecido esplênico (Santana *et al.*, 2008). Apenas animais de baços TIPO1 e TIPO3 foram incluídos nesse estudo, por serem considerados grupo polares. Quando necessário, serão utilizadas as seguintes siglas

para identificações dos animais: TIPO1-INF, para animais de baço TIPO1 que são infectados; TIPO3-INF, para animais de baço TIPO3 que são infectados; e TIPO1-CONT, para animais de baço TIPO1 e não infectados.

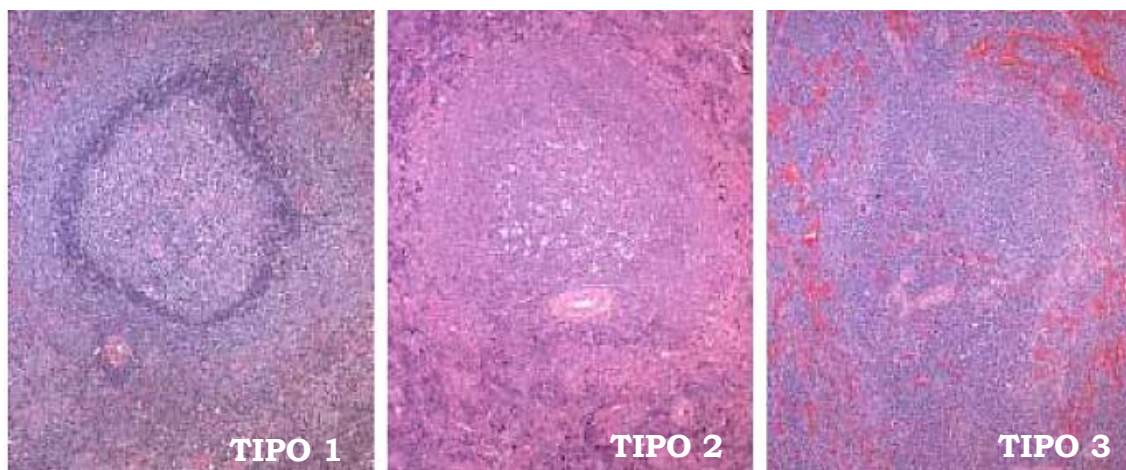


Figura 4. Microfotografias representativas de polpa branca esplênica organizada, baço TIPO1 (A), levemente desorganizada, baço TIPO2 (B) e extensivamente desorganizada, baço TIPO3 (C) (200X). Fonte: SANTANA et al, 2008.

2.2.4 FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DO BAÇO

A fenotipagem das células dos baços foi realizada através de reações de imunohistoquímica conforme procedimento descrito por Ruiz e colaboradores (2005) (RUIZ 2005). Para isso, secções dos tecidos esplênicos com espessura de 4,0 μm foram montadas em lâminas previamente tratadas em solução de Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). As secções foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Posteriormente, foi feita a recuperação de sítios antigênicos com exposição das lâminas a tampão citrato na concentração de 0.1 mM e pH = 6.0 (para reações com os anticorpos anti-CD3 e anti-S100) ou tris-EDTA at pH 8.9 (para reações com anticorpos anti-Ki67 e anti-CD79a) em vapor. A partir dessa etapa utilizou-se o sistema de detecção Novolink Max Polymer (Novocastra, Newcastle, Reino Unido) para amplificar a marcação das

populações celulares de interesse. Para o bloqueio da peroxidase endógena as secções foram incubadas com *Peroxidase Block* por 5 minutos sob temperatura ambiente (T.A.). Em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos em solução salina tamponada com fosfato e incubadas com *Protein Block* por 5 minutos (T.A.) para bloquear ligações inespecíficas. As lâminas foram novamente lavadas PBS e incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida com os anticorpos monoclonais primários: anti-Ki67 humano (células proliferantes), anti-CD3 humano (célula T), anti-CD79 α humano (células B) e anti-S100 (célula dendrítica folicular). Como controle negativo, secções foram incubadas pelo mesmo tempo com imunoglobulinas do mesmo isotipo. Após novas lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com *Post Primary Block* (T.A.) por trinta minutos. Posteriormente, foi feita a incubação com *Polymer* (T.A.) e ao final de trinta minutos, as secções foram lavadas sob leve agitação e foi feita a revelação com *DAB solution* (T.A.). Após a revelação, as lâminas foram lavadas sucessivas vezes com água corrente e destilada, contra-coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas com lamínulas utilizando bálsamo do Canadá. Os detalhes de titulação, clone e fabricante dos anticorpos utilizados foram definidos previamente e estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na fenotipagem de esplenócitos

Anticorpo	Clone	Titulação	Fabricante	Código
Anti-Ki67	MIB-1	1/1000	Dako	M7240
Anti-CD3	F7.2.38	1/400	Dako	M7252
Anti-CD79a	HM57	1/100	Dako	M7051
Anti-S100	Policlonal	1/100	Dako	N1573

2.2.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NO BAÇO

Imagens das seções baço corados com os diferentes anticorpos foram capturados em uma resolução de 1.280 x 1.024 pixels usando um sistema de câmera de vídeo digital Evolução LC (Media Cybernetics , Estados Unidos), acoplado a um microscópio óptico (CX41 , Olympus , Japão). A polpa vermelha e os vários compartimentos da polpa branca, incluindo a bainha periarteriolar de linfócitos (PALS), folículos linfóides (FOL) e zona marginal (GRAYSON *et al.* 2003), foram morfometricamente estimadas utilizando o software Imagem Pro Plus versão 6.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos).

Os limites de cada compartimento foram definidos usando seções de H&E e confirmadas com cortes as seções de baço marcadas com anti-S100. Os diferentes compartimentos da polpa branca do baço foram identificados de acordo com as descrições da estrutura histológicos do baço.

Para a contagem de células, foram selecionadas ao acaso áreas não sobrepostas na polpa vermelha e dos compartimentos da polpa branca. Para minimizar o erro nas medições dos tamanhos dos compartimentos de polpa branca, foram utilizados os seguintes critérios: (1) as regiões associadas aos cinco maiores folículos de cada secção foram selecionados para análise dos folículos linfóides e zona marginal e (2) somente arteríolas representadas em seção transversal foram utilizadas para análise da PALS.

A média das medidas obtidas a partir de cada compartimento da polpa branca foi usada para estimativas da densidade de população de células em cada compartimento (densidade de população de células = número de células / área definida) e o número total de células de uma secção transversal do compartimento (número médio de células por secção do

compartimento = densidade de população de células no compartimento x área média do compartimento). A Figura 5 mostra as definições dos compartimentos da polpa branca do baço utilizados na morfometria.

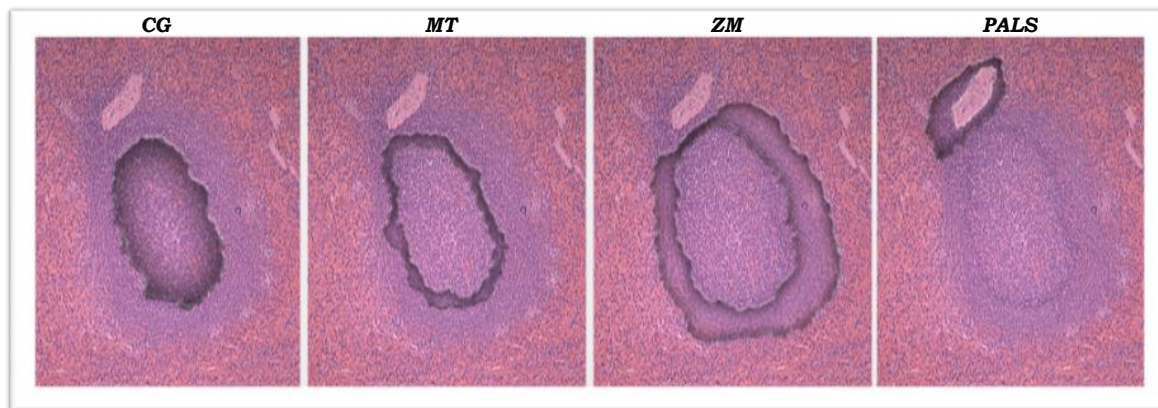


Figura 5. Definições dos compartimentos esplênicos considerados na morfometria. CG = Centro Germinativo; MT = Região do Manto; ZM = Zona Marginal e PALS = Região periarteriolar de linfócitos T. CG e MT são sub-regiões integrantes do FOL (foliculo linfóide). Fonte: Silva et al, 2010.

2.2.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS DO BAÇO POR PCR EM TEMPO REAL

A expressão das quimiocinas CXCL13, CCL19 e CCL21, das citocinas TNF-alfa, linfotóxina-alfa, linfotóxina-beta, TGF-beta, IL10, IFN-gama e do receptor de quimiocina CCR7, potencialmente envolvidos no processo de desestruturação do tecido esplênico, foram mensuradas através de RT-PCR em tempo real nos baços de cães com tecido esplênico TIPO1 (n = 13) e TIPO3 (n = 12). Inicialmente os fragmentos dos baços congelados e mantidos no nitrogênio líquido foram cortados na espessura de 3,0 mm x 3,0 mm com auxílio de lâmina de bisturi, em seguida descongelados e macerados em 1,0 ml de Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) para extração de RNA total, de acordo com o protocolo do proposto pelo fabricante. A quantidade e a pureza do RNA extraído foram examinadas por espectrofotometria (NanoDrop). Foi considerado indicador de pureza aceitável a razão entre 1,8 e 2,05 entre os valores obtidos com as mensurações utilizando as faixas de

absorbância de 260 nm e 280 nm. A integridade do RNA foi examinada por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio. O resultado foi observado através do Software Quantity One e fotografado pelo equipamento de fotodocumentação Gel DOC XR Bio-Rad. Na Figura 6 observa-se uma fotografia representativa de um gel de agarose demonstrado a integridade do RNA extraído dos baços dos cães utilizados nesse estudo.

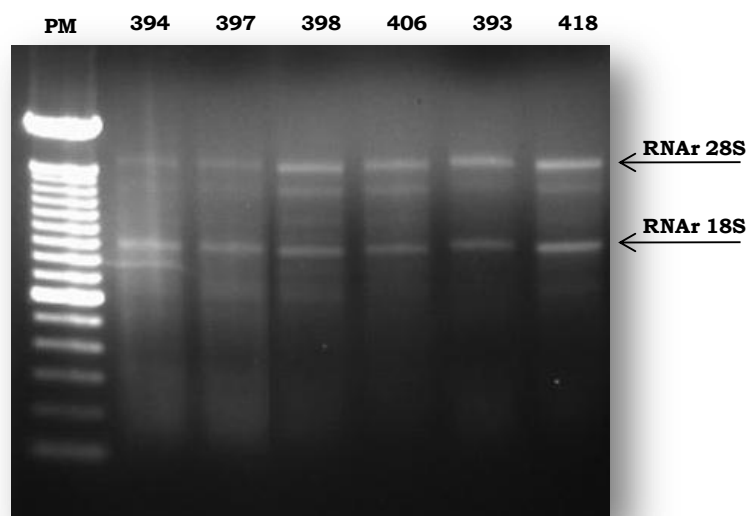
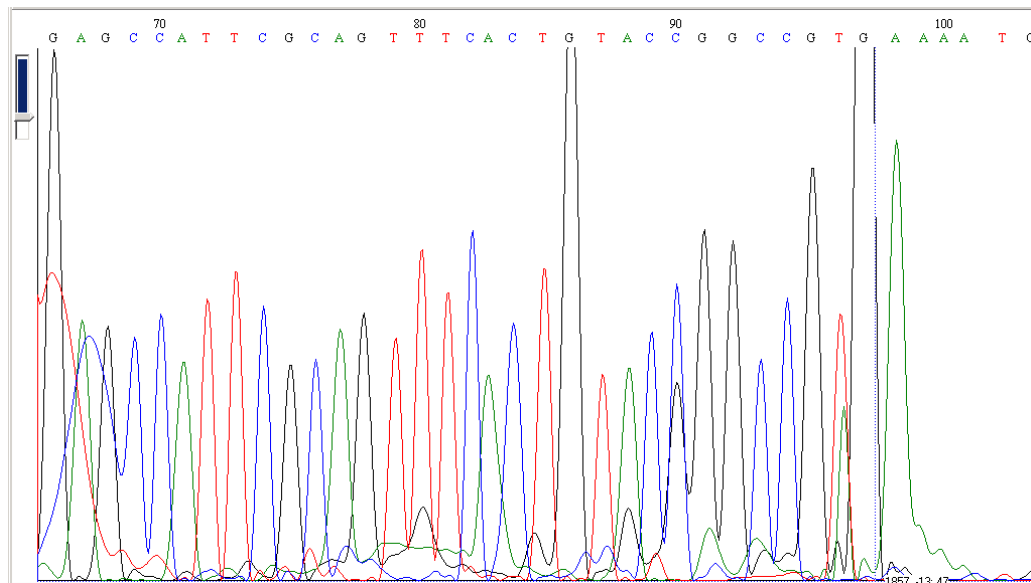


Figura 6. Fotografia de um gel de agarose, demonstrando a integridade dos RNA extraídos dos baços dos cães de uma área endêmica para LV. À esquerda, marcador de peso molecular (P.M.) de 100 pares de bases de DNA. Cada número representa um animal. As setas indicam as bandas de RNA ribossômico, 18S e 28S. Fonte: SILVA et al, 2010.

Visando eliminar a possibilidade de contaminação das amostras de RNA extraído com DNA genômico, amplificação controle foi realizada sem adição da enzima transcriptase reversa. Desde que foi visto que muitas amostras tratadas nesta condição amplificaram os genes testados, decidimos realizar a purificação do RNA extraído. Para isso, usou-se um protocolo de digestão por DNase com o Kit RNeasy (Qiagen) sendo dessa forma abolida a amplificação de genes na ausência da transcriptase reversa. Dessa forma, a partir de 1µg do RNA purificado foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) usando o sistema Superscript II

Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos) utilizando-se primers randômicos. O cDNA obtido foi ressuspendido em água livre de nucleases, aliquotado e estocado em freezer a -20° C. A reação PCR em tempo real foi feita em um volume de 20ul de reação incluindo 5,0 ul de cDNA na concentração de 2ng/mL, 1,0 ul dos primers (4,0 pmol/ μ L), 4,0 uL de água livre de nuclease e 10,0 ul de SYBR Green PCR Master MIX (Applied Biosystems). Para cada gene de interesse, a reação foi realizada em duplicata, com controle negativo em triplicata em cada placa. Curvas padrões em triplicatas foram feitas em uma diluição seriada (1:5) a partir de um *pool* de cDNA das amostras na concentração de 10ng/mL. As concentrações de RNAm das citocinas para cada amostra foram calculadas baseadas na curva padrão e normalizados pelas concentrações de RNA total de 18S e RNAm de Beta-actina. Todas as reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços, lidas em um termociclador com leitura de fluorescência (ABI Prims 7500) e analisadas com o software Sequence Detection System 1.1, todos fabricados pela Applied Biosystems (Foster City, CA, Estados Unidos). As seqüências dos pares de primers e as temperaturas de anelamento (T_m) utilizadas para amplificação de cada gene de interesse estão descritos na tabela 2. A especificidade dos primers para amplificação dos genes de interesse foi confirmada pelo sequenciamento dos produtos da amplificação. O seqüenciamento foi realizado pela Plataforma de Seqüenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ (exemplo na Figura 7).



> [gb|DQ287955.1](#) Canis familiaris 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=474

Score = 167 bits (90), Expect = 6e-41
Identities = 92/93 (98%), Gaps = 0/93 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 3  ATGGCTCATTAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTTGCTCGCTCCTCTCCTACTTGGATAAC 62
          |||
Sbjct 87  ATGGCTCATTAATCAGTTATGGTTCCTTTGGTTGCTCGCTCCTCTCCTACTTGGATAAC 146

Query 63  TGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCCGACGG 95
          |||
Sbjct 147 TGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCCGACGG 179

```

Figura 7. Cromatograma referente ao seqüenciamento do produto amplificado com o primer 18S. Observa-se uma homologia de 98% entre a seqüência obtida e a seqüência do genoma canino armazenado no GenBank. Fonte: SILVA et al, 2010.

Tabela 2. Sequências de primers e temperatura de anelamento utilizadas na PCR em tempo real.

Primer	Forwad primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Tm
18S	CACGGCCGGTACAGTGAAAC	CCCGTCGGCATGTATTAGCT	60°
β -actina	CTCACGGAGCGTGGCTACA	GGCGACGTAGCAGAGCTTCTT	60°
CCL19	GTAGACTGCCTGCCGTTGTGTTCA	ACTGCTGTGGCCCTTGTCTTTG	60°
CCL21	GCACAGGACTGTTGCCTCAA	CGGTAGCTGCGGACAACCT	55°
CCR7	GGTGGTGGCTCTCCTTGTCATTTT	AGTCCGCACGTCTTTCTTGAAGC	55°
CXCL13	GGGTGCCCAAAAAGAGAAATC	GATGGGAGGGTTCAAGCATACA	55°
LT- α	GAGACCCCAGCATCCAGAAC	AAGGCACGATCCGTGTTTG	60°
LT- β	CGGCTGGGAGGCGAAGAAAG	GGTAGGCGACGTGACAGTAGAGGT	60°
IL10	CCACGACCCAGACATCAAGAA	ACAGGGAAGAAATCGGTGACA	60°
TGF- β	CCACTGTTCTGTGACAGCAA	GTCGGTTCATGCCATGAATG	60°
TNF- α	AGCAAACCCCGAAGCTGAG	CGGCACTATCAGCTGGTTGTC	60°
INF- γ	AAGGAAGACATGCTTGGCAAG	CCTGCAGATCGTTCACAGGAA	60°

2.2.7 PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA*

Foram utilizados dados disponíveis de PCR convencional para detecção de DNA de *Leishmania* nos baços dos animais coletados no ano de 2004. Para detecção de DNA do parasito em amostras de baço congeladas dos animais coletados nos anos de 2006 e 2008 (sete animais com baço organizado e oito animais com tecido linfóide esplênico desorganizado) a técnica de PCR em tempo real foi utilizada. Ambas as técnicas estão descritas abaixo.

Extração de DNA: Fragmentos de baço congelados foram macerados em 400 µl de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, EDTA, pH 8,5) , centrifugados durante 5 minutos a 12.000 g. O sedimento foi ressuspensão em 40 µl de SDS (10%) e 4 mL de proteinase K (20 mg/mL), homogeneizou-se e incubou-se durante 2 horas a 42°C. A extração com fenol - clorofórmio e álcool isoamílico (Invitrogen Life Technologies, EUA) foi realizada e seguida de precipitação com 800 µl de etanol a 100 % e 40 µl de acetato de sódio (3M). A mistura foi incubada durante a noite a -20 °C e depois centrifugada a 12000 × g durante 5 min. O sedimento foi lavado com 1 ml de etanol a 70% e centrifugado a 12000×g durante 5 minutos, secou-se durante vários minutos, re-hidratados em água (100 µl) e armazenados a -20°C.

PCR convencional para detecção do DNA de *Leishmania*: A PCR foi realizada com os primers 5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(L/C)CGAA-3' e 5'-(L/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3', que têm como alvo a amplificação de uma região conservada de 120pb do minicírculo de *Leishmania*. A reação foi preparada contendo 50 mmol/L de KCl, 10 mmol Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 mmol/L de cada desoxirribonucleótido (Invitrogen) , 1 mmol/L de cada iniciador, 1,25 unidades de polimerase Taq (Invitrogen) e 2,5 µl da amostra de DNA do baço em um volume final de 25 µl. As condições de PCR foram as seguintes: Desnaturação a 94 °C durante 3 min, seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30s, 55°C durante 30s e 94°C durante 45 segundos, com uma extensão final de 72°C durante 10 min. As reações de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, seguida de coloração com brometo de etídio e visualização sob luz UV. DNA da cepa de referência de *L. braziliensis* MHOM/BR/75/2904 foi utilizado como um controle positivo.

PCR em tempo real para a detecção de DNA de *Leishmania*: Este ensaio foi realizado utilizando uma técnica previamente descrita (BOSSOLASCO et al 2003), visando uma sequência do gene SSU rRNA.

As amplificações foram realizadas em um volume final de 25 μ l, que consistiu em 5 μ l de DNA do baço diluído em água desionizada para 150 ng/mL e 20 μ L da mistura de PCR, que incluía 12,5 μ l dos Universal Mastermix Applied Biosystems (Perkin-Elmer), um primer forward (5'-AAGGTCAAAGAACAAGGCCAAG-3') a uma concentração final de 900 nM, de um primer reverso (5' - GCATCGGAGTCGG - 3 ') a 300 nm e uma sonda fluorogénico (5'- AGGAGCGTGTCCCCGTGGAGG - 3') contendo uma molécula repórter FAM na extremidade 5' e um quencher TAMRA na extremidade 3' (sonda LEIP) (Perkin-Elmer Applied Biosystems) a uma concentração final de 200nM. Uma curva padrão foi gerada utilizando diluições em série de DNA de *L. infantum* com 10^6 a 10^{-1} parasitas/mL, e cada diluição foi efetuada em triplicata. As amplificações foram realizadas em triplicata para cada amostra e para o controle negativo utilizando um sistema de detecção ABI Prism 5900 sequência de (Perkin-Elmer Applied Biosystems). A curva padrão foi gerada através da representação gráfica dos valores de Ct contra as concentrações de parasitas.

2.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos são mostrados como tabelas e gráficos e representam os valores absolutos, médias, medianas ou proporções como indicado. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi testada usando o teste de Mann-Whitney. Para as comparações envolvendo mais de dois grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para as comparações envolvendo proporções, foi utilizado o teste do Qui-quadrado com correção de Yates ou o teste exato de Fisher. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA DE CÃES

Os sinais clínicos de leishmaniose visceral foram mais freqüentes nos animais com baço TIPO3 (7/12 animais polissintomáticos) do que em animais com baço TIPO1 (apenas 2/13 foram polissintomáticos, teste do Qui-quadrado, $P = 0,01$). Não houve diferenças significativas no gênero, no número de testes positivos para a infecção por *Leishmania* ou na carga parasitária no baço, entre os dois grupos. No entanto, 50% dos animais com baço TIPO3 tinham carga parasitária de 35.294 parasitas por 100 mg do baço, ao passo os animais com o baço TIPO1 tinham carga parasitária de 3.514 leishmanias, ou seja, menos parasitas por 100 mg de baço (Tabela 3).

Tabela 3. Características gerais da amostra de animais de uma área endêmica para leishmaniose visceral.

Parâmetros positivos	Estrutura histológica do baço		Significância
	TIPO1 (n = 13)	TIPO3 (n = 12)	
Gênero	F=7/M=6	F=5/M=7	$P = 0,70^a$
Categoria clínica ^b			
Oligossintomático	11	5	
Polissintomático	2	7	$P = 0,01^a$
Teste positivo para infecção por <i>Leishmania</i> :			
Cultura de baço	6/13 (43%)	6/12 (50%)	$P = 1,00^a$
Sorologia	8/13 (62%)	8/12 (67%)	$P = 1,00^a$
TCL	2/13 (15%)	1/12 (8%)	$P = 1,00^a$
PCR	12/12 (100%)	11/11 (100%)	$P = 1,00$
Parasitas/100 mg de baço ^c			
25% percentil	$1,8 \times 10^3$	$6,2 \times 10^2$	
Mediana	$3,5 \times 10^3$	$3,4 \times 10^4$	$P = 0,96^d$
75% percentil	$1,9 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	
Pelo menos 1 teste positivo	13/13 (100%)	12/12 (100%)	

a = Teste de probabilidade de Fisher; b = com 1 a 3 sinais clínicos (oligossintomático), com mais de 3 sinais clínicos (polissintomáticos), c = PCR em tempo real de 8 animais de cada grupo coletados mais recentemente. d = Teste de Mann-Whitney

3.2 DISTRIBUIÇÕES DA POLPA VERMELHA E COMPARTIMENTOS DA POLPA BRANCA EM BAÇOS DESORGANIZADOS

A proporção de áreas de polpa branca em relação à secção esplênica total foi maior nos animais com tecido esplênico organizado, TIPO1 ($12 \pm 3,7\%$) que nos animais com tecido linfóide esplênico desorganizado, TIPO3 ($5,7 \pm 4,3\%$, teste Mann-Whitney, $P < 0,03$) representando, portanto, redução de duas vezes da área correspondente à polpa branca em animais com tecido desorganizado. A proporção de áreas de polpa vermelha em relação à secção esplênica total foi maior nos animais com baço TIPO3 ($88 \pm 3,8\%$) que nos animais com baço TIPO1 ($93 \pm 3,8\%$, teste Mann-Whitney, $P < 0,03$).

Foi observada uma redução significativa da área dos folículos nos animais com baço TIPO3 ($0,03 \pm 0,03 \text{ mm}^2$) em relação aos animais com o baço TIPO1 ($0,13 \pm 0,05 \text{ mm}^2$, teste Mann-Whitney, $P < 0,01$). Também foi observada uma diminuição da área da zona marginal nos animais com baço TIPO3 ($0,15 \pm 0,07 \text{ mm}^2$), em relação à zona marginal dos animais com baço TIPO1 ($0,28 \pm 0,14 \text{ mm}^2$, teste Mann-Whitney, $P < 0,01$). A razão da área da região periarteriolar foi similar entre os dois grupos de animais (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativa das áreas representadas pelos diferentes compartimentos dos baços de cães naturalmente infectados com Leishmania

Compartimentos do baço	Estrutura histológica do baço			
	TIPO1	TIPO3	Razão ¹	Significância ²
Polpa Vermelha ³	$88,0 \pm 3,8$	$93 \pm 3,8$	0,9	$P < 0,03$
Polpa branca ³	$11,5 \pm 3,7$	$5,7 \pm 4,3$	2,0	$P < 0,03$
PALS ⁴	$0,063 \pm 0,04$	$0,068 \pm 0,06$	0,9	$P = 0,67$
Folículo ⁴	$0,13 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,03$	3,4	$P < 0,01$
Zona Marginal ⁴	$0,28 \pm 0,14$	$0,15 \pm 0,07$	1,9	$P < 0,01$

¹ Razão baço organizado/desorganizado; ² Teste T não pareado test ou teste Mann Whitney quando recomendado. ³ Proporção de tecido esplênico representado na secção histológica⁴ Média e desvio padrão da area em mm^2 .

3.3 DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES DO BAÇO

3.3.1 ANÁLISE QUALITATIVA DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR

A marcação com os diferentes anticorpos revelaram similar distribuição de populações nos baços dos animais com baço TIPO1 (organizado) ou TIPO3 (desorganizado).

Células CD3⁺ (linfócitos T) - se encontravam preferencialmente em torno da região periarteriolar, em densos agregados e de maneira mais difusa e esparsa nos folículos, zona marginal e polpa vermelha. Na polpa vermelha, essas células se distribuíam em pequenos agregados ou de forma rendilhada (Fig. 8B).

Células CD79 α ⁺ (linfócitos B) - observadas predominantemente folículo, mais densamente agrupadas na região do manto (quando presente), tornando-se menos densa a marcação nos centros germinativos. Na polpa vermelha, as células B se encontravam preferencialmente em pequenos agregados e nos cordões de Billroth. Em todos os compartimentos esplênicos foram vistos três padrões de marcação para a população de células B: células marcadas no citoplasma (a), ou fortemente marcadas no núcleo (b) ou com membrana nuclear marcada (c) (Fig. 8C);

Células Ki-67⁺ (células proliferantes) – presentes no centro germinativo onde apresenta agregados assimétricos, no manto e na zona marginal e na polpa vermelha tem distribuição mais esparsa (Fig. 8D);

Células S100 (células dendríticas foliculares) - predominantemente encontradas delimitando as margens externas dos compartimentos de polpa branca). Algumas destas células também foram encontradas dispersas na polpa vermelha.

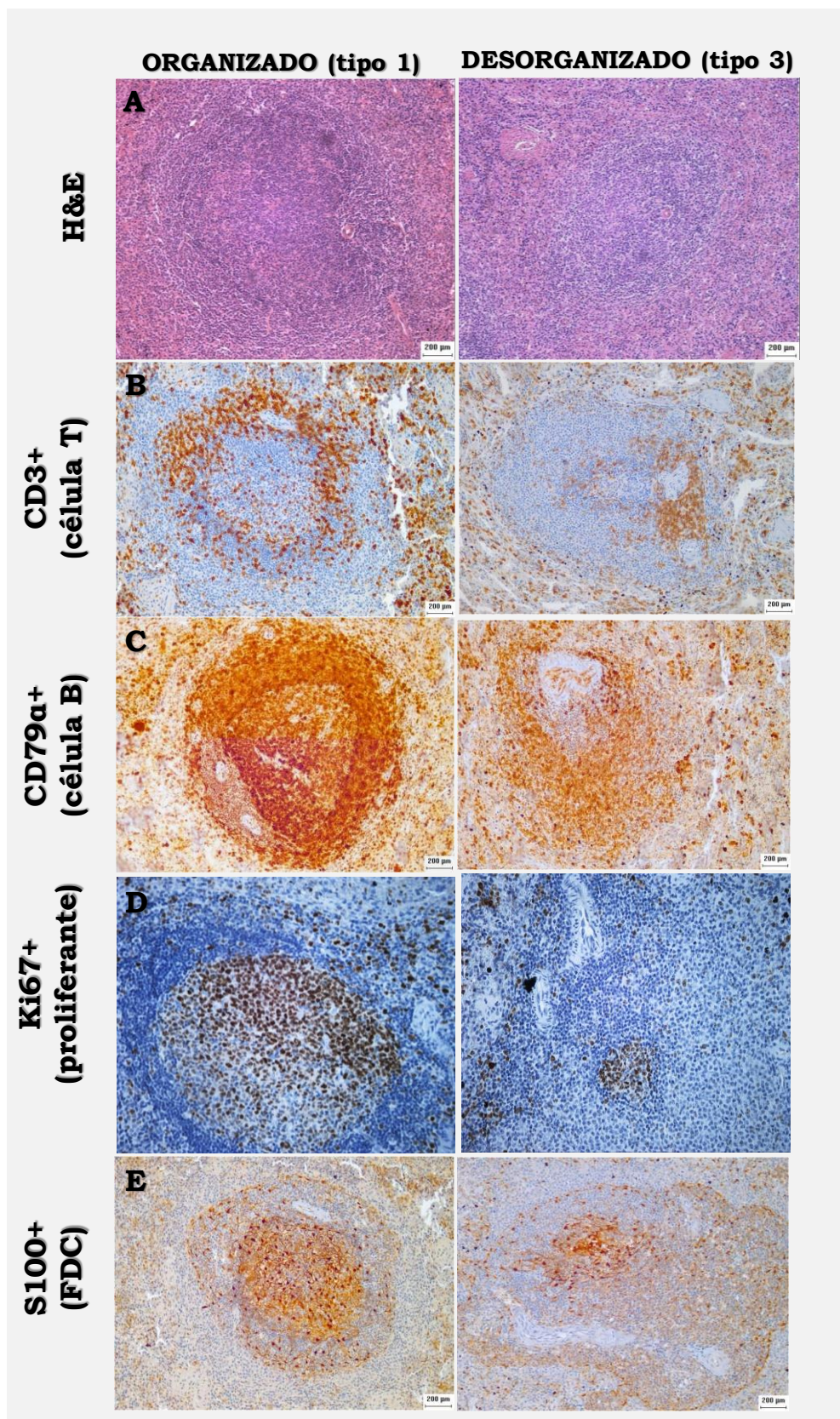


Figura 8. Distribuição de linfócitos B, linfócitos T, células dendríticas foliculares e células em proliferação. Microfotografias representativas das secções marcadas dos tecidos esplênicos organizados e desorganizadas marcadas com anticorpo específico (200X).

3.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA QUANTITATIVA

DENSIDADE CELULAR

A densidade de células B (CD79 α +) foi maior nos folículos linfóides de cães com baço TIPO1 (37369 ± 8177 células/mm²) que nos folículos linfóides de animais com baço TIPO3 (13932 ± 7353 células/mm², teste Mann-Whitney, $P < 0,02$). A densidade de células B também foi menor na zona marginal dos animais de baço TIPO3 (11877 ± 3449 células/mm²) do na zona marginal dos animais de baço TIPO1 (16553 ± 4826 células/mm² teste Mann-Whitney, $P < 0,05$). Não houve diferenças na densidade de linfócitos B nos demais compartimentos do tecido esplênico entre os dois grupos de animais em estudo.

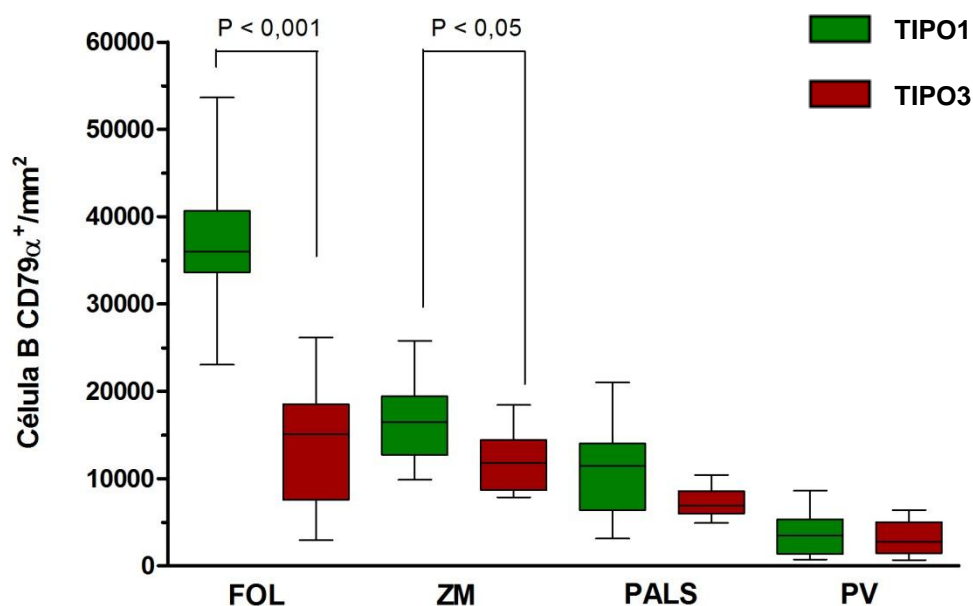


Figura 9. Densidade de células B. Número de células CD79 α + por mm² nos diferentes compartimentos do baço de animais com tecido esplênico organizado e desorganizado. Teste Mann-Whitney, $P < 0,05$. FOL = folículo, ZM = zona marginal e PALS = região periarteriolar. Tipo 1 = Animais de baço organizado e infectados. Tipo 3 = Animais de baço desorganizado e infectados.

A densidade de células proliferantes (células Ki-67⁺) foi maior no FOL de animais com polpa branca esplênica TIPO1 (7613 ± 1638) células/mm² do que em animais com polpa branca esplênica TIPO3 (3199 ± 2167 células/mm², teste Mann-Whitney, P < 0,01). Também a densidade de células em proliferação foi maior na polpa vermelha dos animais com baço TIPO1 (2000 ± 1321 células/mm²) que na polpa vermelha dos animais com baço TIPO3 (1136 ± 1207 células/mm², teste Mann-Whitney, P < 0,05).

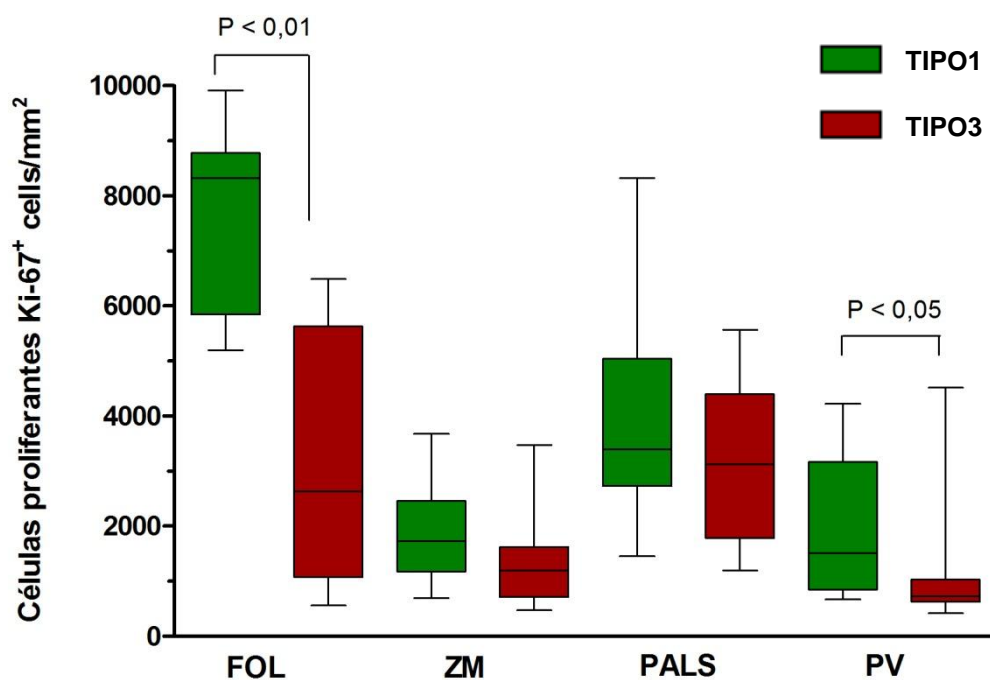


Figura 10. Densidade de células proliferantes. Número de células Ki67⁺ por mm² nos diferentes compartimentos do baço de animais com tecido esplênico organizado e desorganizado

A densidade de linfócitos T (células CD3⁺) foi maior na região PALS que nos outros compartimentos do tecido esplênico em animais com tecido linfóide organizado (TIPO1) ou desorganizado (TIPO3). No entanto, não houve diferença nas densidades de linfócitos T entre os dois grupos de animais nas diferentes regiões da polpa branca ou na polpa vermelha. Também não foi observada diferença na densidade de células dendríticas foliculares (FDC - S100⁺) entre os diferentes compartimentos da polpa branca esplênica.

ESTIMATIVA DO NÚMERO CÉLULAS POR SECÇÃO NOS COMPARTIMENTOS DA POLPA BRANCA

Desde que a densidade de células nos diferentes compartimentos do tecido esplênico oferece apenas uma visão parcial da distribuição das populações celulares no baço, procuramos refinar a quantificação dessas populações corrigindo pela área ocupada pelos diferentes compartimentos do baço.

O número de células B (CD79 α ⁺) foi maior nos folículos e nas zonas marginais de cães com baço TIPO1 (5083 \pm 2357 e 3687 \pm 1189 células, respectivamente) que nos folículos e zonas marginais de cães com baço TIPO3 (508 \pm 536 e 1774 \pm 1041 células, Teste Mann-Whitney, P < 0,02, Figura 10).

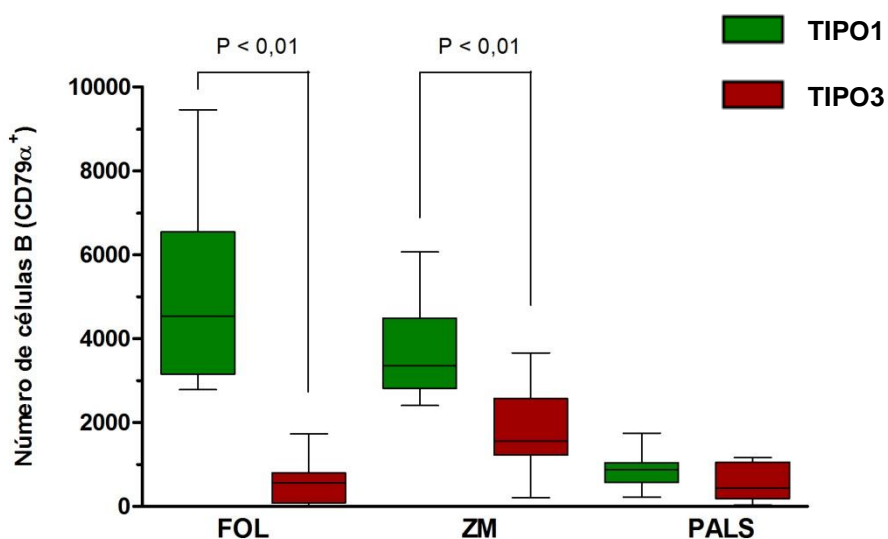


Figura 11. Número total de células B CD79⁺ em cada compartimento esplênico. Os valores correspondem às densidades corrigidas pela média das áreas totais de cada compartimento.

Número de células dendríticas foliculares S100⁺ foi maior nos folículos de animais com baço TIPO1 (187 \pm 91 células) do que nos folículos dos animais de baço TIPO3 (97 \pm 56 células, Teste Mann-Whitney, P < 0,05, Figura 12).

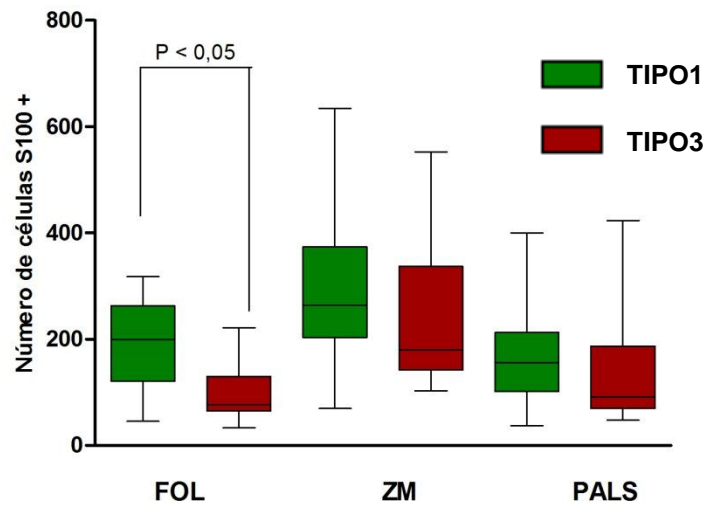


Figura 12. Número total de células FDC S100+ em cada compartimento esplênico. Os valores correspondem às densidades corrigidas pela média das áreas totais de cada compartimento.

O número de células proliferantes (Ki-67⁺) foi maior nos folículos de cães com baço TIPO1 (1038 ± 445 células) do que em folículos de cães com tecido esplênico TIPO3 (192 ± 256 células, teste Mann-Whitney, P < 0,01, Figura 13).

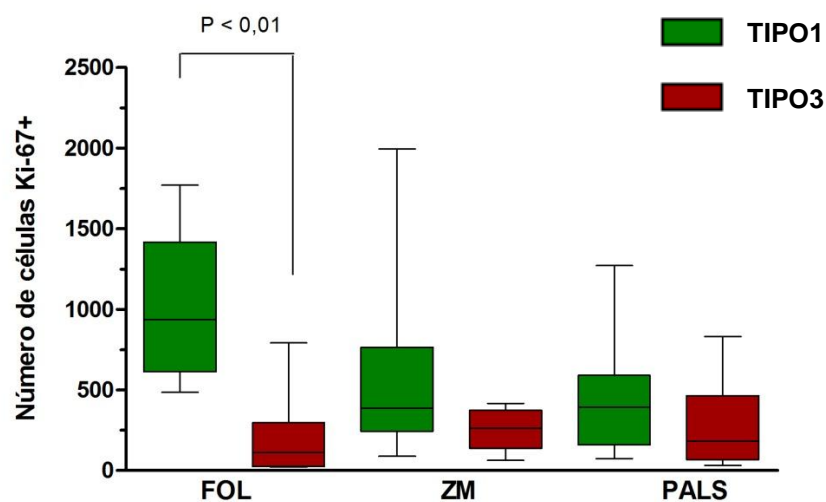


Figura 13. Número total de células proliferantes Ki67+. Os valores correspondem às densidades corrigidas pela média das áreas totais de cada compartimento.

Da mesma forma das outras populações celulares, o número de células T (CD3⁺) foi maior nos folículos de cães com baço TIPO1 (773 ± 494 células) do que em folículos de cães com baço TIPO3 (360 ± 295 células, teste Mann-Whitney, P < 0,01, Figura 14).

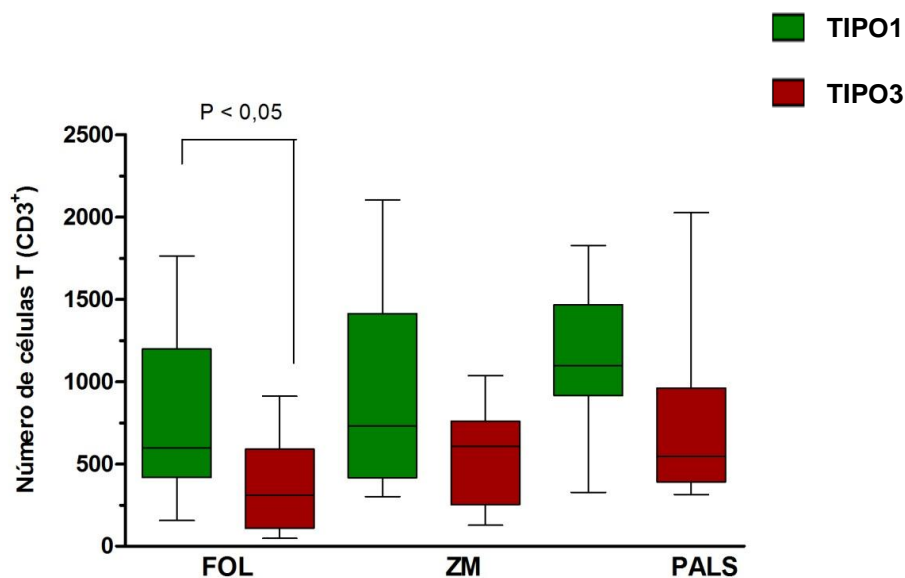


Figura 14. Número total de células T CD3⁺. Os valores correspondem às densidades corrigidas pela média das áreas totais de cada compartimento.

3.5 EXPRESSÃO DE CITOCINAS DO BAÇO DE CÃES

A estimativa da expressão de citocinas no baço dos cães foi feita utilizando-se a subunidade 18S de RNA e β -actina como genes constitutivos de referência. A expressão da quimiocina CXCL13 e da citocina Lta foram maiores em baços de animais com polpa branca do TIPO1 (Teste de Mann-Whitney, P<0,01 e P<0,05, respectivamente) quando comparados com animais de baço TIPO3. Não houve diferença estatística entre os dois grupos de animais, na expressão do receptor de quimiocina, CCR7, nem das outras citocinas avaliadas - TNF-alfa, Interferon-gama, IL10, CCL19 e CCL21 (Fig. 15). Quando analisamos as expressões das citocinas usando o gene endógeno β -actina, observamos uma redução da expressão de CXCL13 nos animais de baço TIPO3, quando comparados com os animais com baço TIPO1 (Teste de Mann-Whitney, P < 0,01, Figura 16).

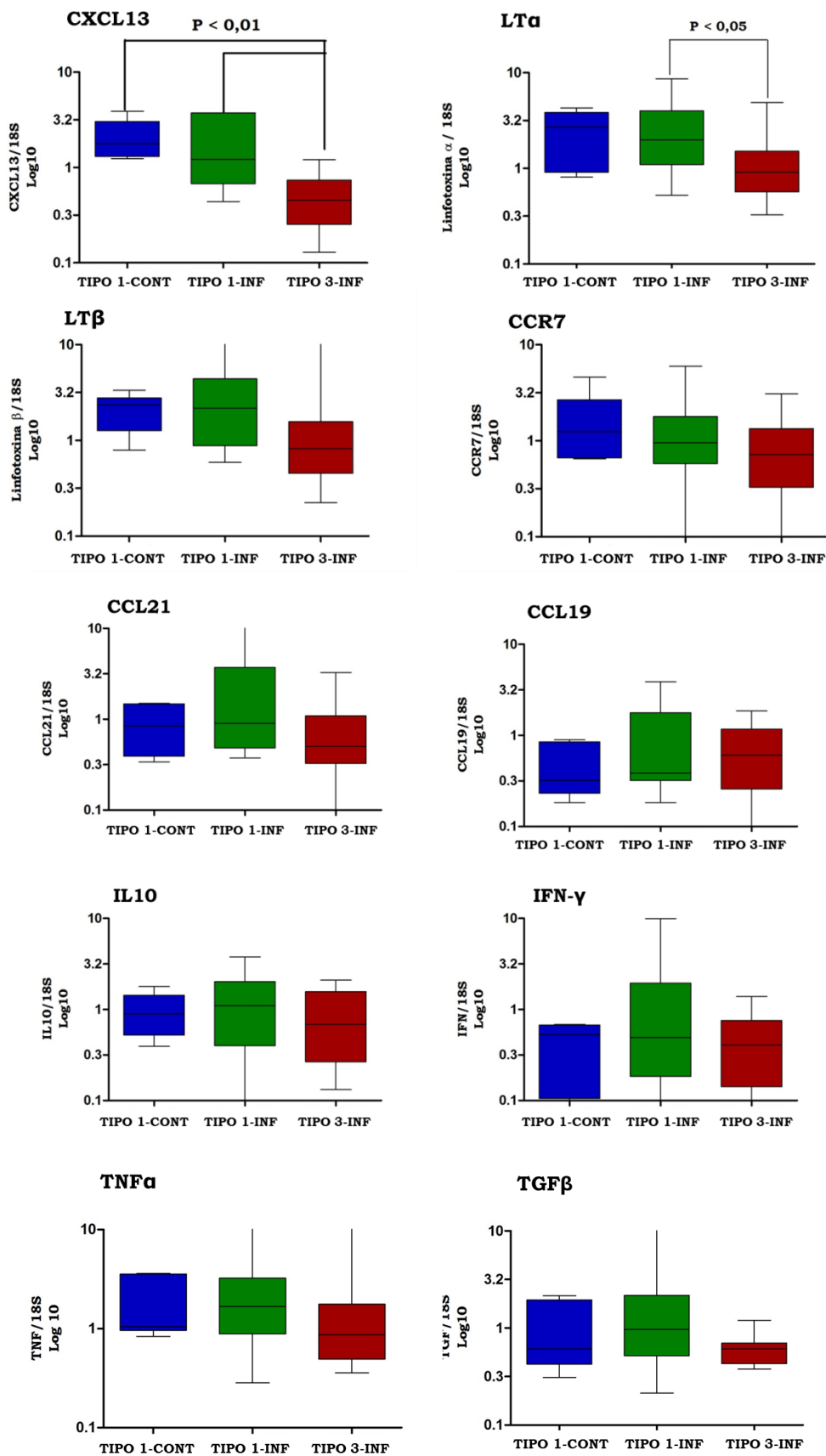


Figura 15. Expressão dos RNAm de citocinas em baço relativo a expressão de 18S. TIPO1-CONT: baço do tipo 1 e não infectados. TIPO1-INF: baço tipo 1 e infectado; TIPO3-INF: baço tipo 3 e infectados. Teste Mann-Whitney, P < 0,05.

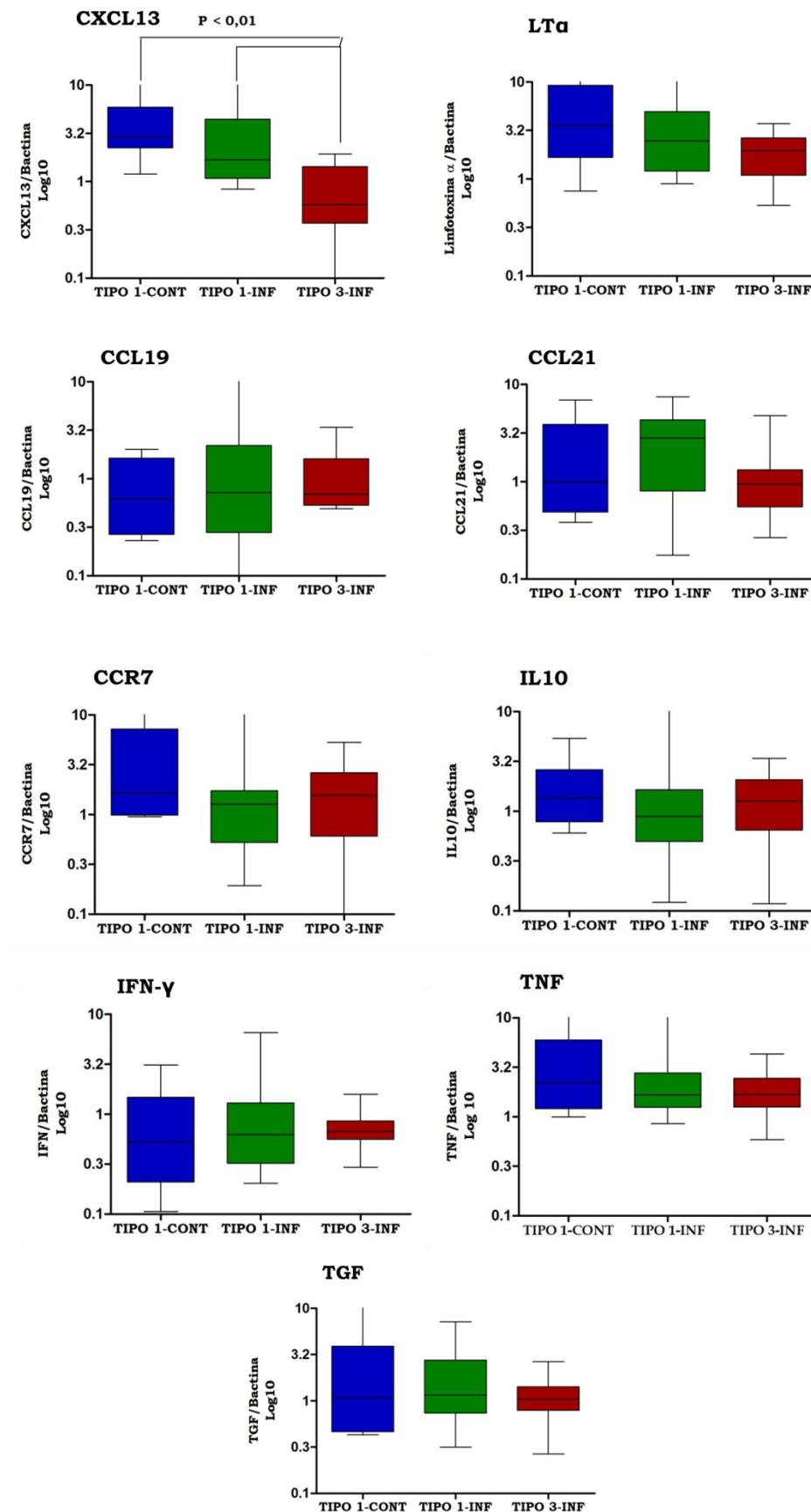


Figura 16. Expressão dos RNAm de citocinas em baço relativo a expressão de β actina. TIPO1-CONT: baço do tipo 1 e não infectados. TIPO1-INF: baço tipo 1 e infectado; TIPO3-INF: baço tipo 3 e infectados. Teste Mann-Whitney, $P < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

A atrofia do tecido linfóide e a desorganização dos microambientes do baço foram observados durante a infecção por *Leishmania*, bem como por outros agentes patogênicos (VERESS *et al.* 1983; ENGWERDA *et al.* 2002; ANDRADE *et al.* 1989). Em um estudo anterior do nosso grupo, verificou-se que estas alterações patológicas do baço foram mais frequentes em cães com padrões clínicos e laboratoriais de susceptibilidade a leishmaniose visceral do que naqueles sem evidência de susceptibilidade à doença (SANTANA *et al.*, 2008).

Neste trabalho, foram estudados dois grupos de cães naturalmente infectados com distinta organização histológica do baço. Cães com uma desorganização estrutural do baço (baço TIPO3) apresentaram um quadro de leishmaniose visceral mais grave do que os animais sem desorganização estrutural do baço (baço TIPO1). Esta observação sobre a relação entre doença clínica e a desestruturação da arquitetura do baço confirma dados de estudos sobre leishmaniose humana (VERESS *et al.* 1977) e concordam com as nossas observações anteriores associando a desorganização do tecido linfóide do baço em cães e susceptibilidade à doença (SANTANA *et al.* 2008).

Alterações no baço, que variam desde hiperplasia a atrofia já foram previamente descritas em seres humanos e cães com leishmaniose visceral (VERESS *et al.*, 1983; VERESS *et al.*, 1977; TRYPHONAS *et al.*, 1977, KEENAN *et al.*, 1984). A ocorrência de hiperplasia seguida de atrofia foi demonstrada por Veress e colaboradores, utilizando um modelo experimental de leishmaniose visceral em hamsters. Tal atrofia e perda de compartimentos de células B do baço coincidiu com fases posteriores e mais graves da doença. Em nosso estudo prévio, verificou-se que os animais com infecção ativa e respostas celulares a antígenos de *Leishmania*, representados pelo teste cutâneo da leishmanina positivo (TCL), exibiam predominantemente hiperplasia da polpa branca

do baço, enquanto a atrofia e a desestruturação da arquitetura linfóide esplênica foram mais freqüentes em animais com infecção ativa, e com TCL negativos (SANTANA *et al*, 2008).

Neste trabalho, foi demonstrado que embora toda a polpa branca tenha sido reduzida em tamanho, os folículos e a zona marginal foram os compartimentos da polpa branca mais gravemente afetados. Estas mudanças na polpa branca foram associadas com a diminuição do número de T e células dendríticas foliculares nos folículos e de células B nos folículos e nas zonas marginais. Este padrão de depleção celular indica uma perda de folículos, com a mudança mais marcante observada na população de células B e comprometimento da formação de centro germinativo. As células B são os principais constituintes dos folículos linfóides, e vários fatores contribuem para a sua entrada, manutenção e proliferação nos compartimentos linfóides do baço.

A organização dos folículos linfóides é mediada pela migração de células B mediada por CXCL13 para o interior do folículo e a presença dessas células nas proximidades de células dendríticas foliculares (FORSTERS *et al*, 1999). CXCL13 também induz a expressão de $LT\alpha 1\beta 2$ na membrana de células B, o qual por sua vez, promove o desenvolvimento de células dendríticas foliculares e expressão de CXCL13 para criar uma rede de retroalimentação positiva (MEBIUS & KRAAL, 2005). Neste trabalho, verificou-se que a expressão de CXCL13 estava diminuída em animais que apresentam distúrbio e atrofia dos folículos linfóides e redução ou ausência de centros germinativos foliculares. Outros estudos têm demonstrado que falhas na expressão do gene para CXCL13 ou o seu receptor (CXCR5) na superfície das células B, resulta na deficiência da migração de células B para o folículo e na falha na formação do centro germinativo, após a exposição ao antígeno (ANSEL *et al*, 2000). Além disso, a tendência de diminuição (estatisticamente significativa quando usado o gene 18S como gene endógeno) na expressão de $LT\alpha$ e $LT\beta$ em animais com histologia do baço

desorganizado sugere que CXCL13 pode ser a principal quimiocina envolvida neste processo. Neste estudo, também demonstramos a diminuição do número de células dendríticas foliculares nos folículos de animais com estrutura de polpa branca desorganizada. A combinação da redução no número de células dendríticas foliculares e da expressão reduzida de CXCL13 pode sugerir uma relação causal, sendo assim, perda de células dendríticas foliculares pode resultar na redução da produção de CXCL13, que em seguida, pode levar falha na migração de células B e atrofia folicular.

Alguns processos patológicos podem ser responsáveis pela disfunção no segmento mais terminal da alça de estimulação positiva linfócito B-LT- α/β -célula dendrítica-CXCL13-linfócito B afetando a manutenção dos folículos linfóides durante a leishmaniose visceral. Smelt e colaboradores propuseram que fatores liberados pelos macrófagos infectados com amastigotas que se infiltram nos folículos linfóides são responsáveis pela destruição das células dendríticas foliculares. Em nosso estudo, embora a maioria dos animais apresentassem evidências de parasitismo do baço por PCR ou cultura baço, macrófagos contendo amastigotas foram menos freqüentemente observada por microscopia óptica do que no estudo de Smelt e colaboradores. No entanto, no presente estudo, cães naturalmente infectados apresentam cargas parasitárias inferiores a modelos experimentais. Portanto, a destruição contínua, porém menos grave das células foliculares dendríticas, que eventualmente leva a perturbação folículo, pode também ser causada por macrófagos infectados (SMELT ET AL, 1997).

Engwerda e colaboradores (2002) também observaram uma diminuição na migração de linfócitos para a zona marginal que foi associada com uma redução na população de macrófagos da zona marginal em camundongos infectados com *L. donovani*. Essa diminuição da migração de linfócitos pareceu afetar a estrutura da zona marginal e do folículo linfóide, e a maioria dessas mudanças foram dependentes de

expressão de TNF (ENGWERDA *et al*, 2002). Embora neste estudo, os animais com a estrutura do tecido linfóide esplênico desorganizado tivessem zonas marginais menores e um menor número de células B associadas a este compartimento, não houve diferença na expressão de TNF entre os grupos de animais. O aumento dos níveis de TNF tem sido observado em modelos experimentais humanos e murinos de leishmaniose visceral (MELBY *et al*, 2001). Melby e colaboradores (2001) encontraram um aumento inicial e conseqüente diminuição na produção de TNF no baço de hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania donovani*. Por isso, não podemos excluir a possibilidade de que períodos de alta produção de TNF podem ocorrer durante o curso natural da leishmaniose visceral canina.

Outra potencial causa da desestruturação do tecido linfóide visto em alguns dos animais é a presença de co-infecções por vírus ou outros agentes patogênicos que contribuem para a desorganização da estrutura do baço. Por exemplo, um padrão semelhante de hiperplasia e atrofia seguido por desorganização de folículos linfóides foi descrito para as infecções virais em seres humanos e animais experimentalmente infectados (BENEDICT *et al*, 2006; JANOSSY *et al*, 1985). Em um estudo sorológico realizado pelo nosso grupo em cães de rua, mostrou uma alta prevalência de infecção por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma* (dados não publicados). Portanto, outras infecções são comuns nesses animais, e nós não podemos excluir a possibilidade de que algumas dessas infecções podem contribuir para a perda da estrutura do tecido linfóide do baço.

No presente estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na expressão de quaisquer outras citocinas testadas, além de CXCL13 entre o grupo de cães infectados e não infectados. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que outras infecções sistêmicas, também prevalente em cães errantes, como mencionado acima, pode modular a expressão de citocinas neste grupo de cães não

infectados. Lage e colaboradores encontraram maiores níveis de expressão de IFN- γ por esplenócitos de cães infectados com *Leishmania* do que em cães não infectados, em um grupo misto de cães errantes e semi-domiciliadas, previamente vacinadas contra a parvovirose, leptospirose, cinomose, parainfluenza e hepatite e tratados de infecção por helmintos intestinais. No entanto, esses autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas na frequência de IL10, IL12, IFN- γ ou TNF entre os animais dos grupos não infectados e infectados com *Leishmania* (LAGE *et al*, 2007).

Finalmente, tem sido proposto que a desorganização da arquitetura esplênica pode ser associada com o comprometimento de retenção de células B ativadas nos folículos, e consequente liberação destas células para a circulação e com uma maior produção de plasmócitos (JANOSSY *et al*, 1985). É sabido que os plasmócitos predominam nos infiltrados inflamatórios observados na leishmaniose visceral (VERESS *et al*, 1977; TRYPHONAS *et al*, 1977) e nós mostramos previamente que a frequência de plasmócitos está aumentada em baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (SANTANA *et al*, 2008).

A desorganização estrutural do baço secundária a leishmaniose e, possivelmente, devido a outras co-infecções pode afetar os microambientes do baço, que são necessários para a ativação de células B, homing de células B de memória e a geração de respostas imunológicas humorais aos antígenos presentes no sangue. Na verdade, a atrofia do baço e desorganização, bem como respostas ineficientes a infecções bacterianas têm sido encontrados em pacientes em estágios avançados de leishmaniose visceral grave (ANDRADE *et al*, 1990; VERESS *et al*, 1977). Um estudo sobre a potencial associação entre desorganização do baço e o surgimento de infecções bacterianas em cães com formas graves de leishmaniose visceral está em andamento em nosso laboratório.

CAPÍTULO 3:

DESESTRUTURAÇÃO LINFÓIDE
E PLASMOCITOSE ESPLÊNICA
NA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA: POTENCIAIS
ALTERAÇÕES NO *HOMING* E
SOBREVIVÊNCIA DE
LINFÓCITOS B TERMINAIS

1. INTRODUÇÃO

A plasmocitose é um achado comum na leishmaniose visceral e mais recentemente foi descrita pelo nosso grupo no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, associada com a desorganização do tecido linfoide (CORBEIL *et al.* 1976, MARTINEZ-MORENO *et al.* 1995, SANTANA *et al.* 2008).

Foi demonstrado no capítulo 2 dessa tese que a desestruturação do baço não atinge uniformemente os compartimentos desse tecido linfoide. Além disso, foi observada uma clara associação dessa desestruturação com a diminuição de algumas populações celulares imunocompetentes, como células dendríticas foliculares e linfócitos B.

Essas alterações se devem principalmente a uma diminuição na expressão de CXCL13, possivelmente resultando em uma incapacidade de formar centros germinativos foliculares e de ativar e diferenciar adequadamente linfócitos B em células efetoras e de memória. O acúmulo de plasmócitos contribui para alterar a arquitetura histológica do baço. A desestruturação de microambientes e a diferenciação anômala de linfócitos B podem comprometer a capacidade de o baço atuar como órgão de vigilância contra infecções sistêmicas ou localizadas particularmente contra infecções bacterianas.

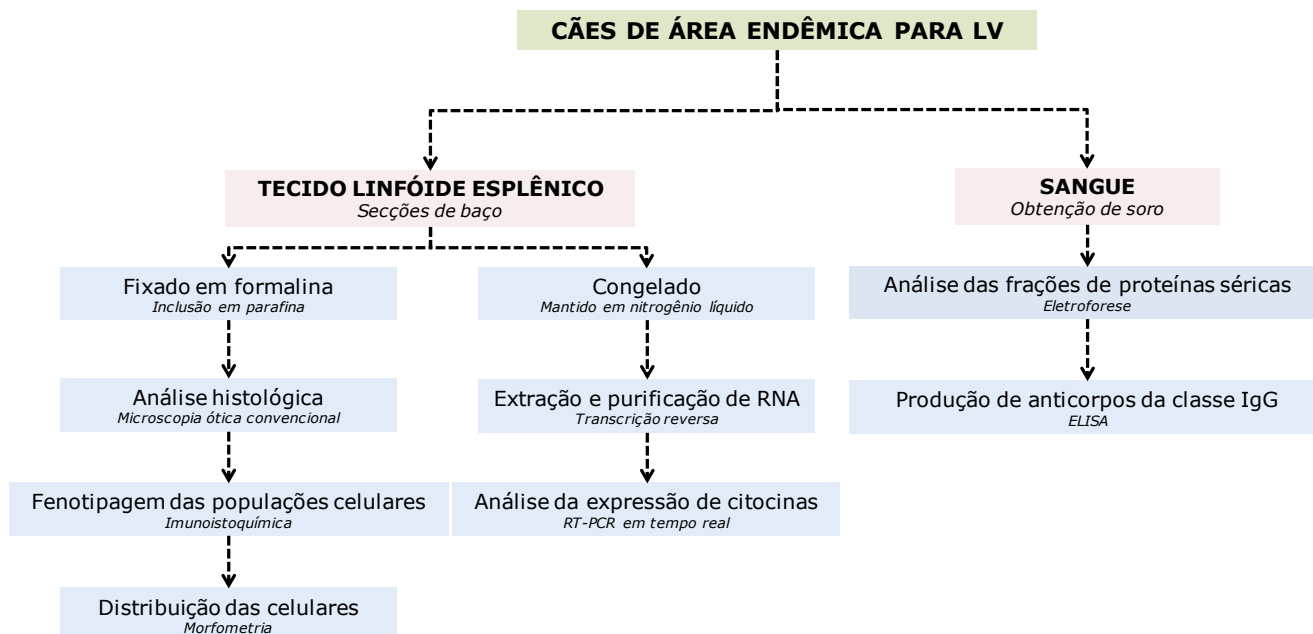
Um dos questionamentos trazidos nesse capítulo é se a plasmocitose esplênica resulta de prolongamento da vida do plasmócitos ou alteração no *homing* dessas células, levando a sua retenção no baço. Sabe-se que em condições normais, plasmócitos gerados a partir da ativação de células B no folículo do baço tem seu *homing* preferencial para medula óssea. Os plasmócitos presentes na PV normalmente vivem apenas poucos dias, sendo por isso, chamados de plasmócitos de vida curta. Por outro lado, os plasmócitos que vão para a medula óssea vão viver por semanas ou meses, e por isso são conhecidos como plasmócitos de

vida longa. Estudos têm demonstrado que a expressão da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 são necessários não somente para o *homing* quanto para a sobrevivência dos plasmócitos na medula óssea (HARGREAVEs *et al*, 2001, CYSTER 1999).

Nesta parte do trabalho foi realizado o “mapeamento” de plasmócitos produtores de diferentes isotipos de anticorpos (IgM e IgG) nos compartimentos da polpa branca e na polpa vermelha através de análise imunoistoquímica e morfometria. Além disso, analisamos as expressões da quimiocina CXCL12, seu receptor (CXCR4) e outras citocinas (BAFF, APRIL, IL6) que estão diretamente relacionadas ao processo de diferenciação, *homing* e manutenção de plasmócitos no tecido linfóide esplênico por RT-PCR real time. Avaliações sobre ativação policlonal de células B e hipergamaglobulinemia também foram realizadas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DESENHO EXPERIMENTAL



2.2 DETALHAMENTO DA METODOLOGIA

2.2.1 ANIMAIS

Este é um estudo retrospectivo baseado em espécimes histológicos e registros experimentais arquivados no Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ (Bahia, Brasil). Os espécimes histológicos representam fragmentos de baço obtidos de cães que foram coletados nas ruas de Jequié (Bahia, Brasil, uma área endêmica para LV) no período de 2006 a 2010, em colaboração com o Programa de Vigilância de Doenças Endêmicas do Serviço de Saúde do Estado da Bahia. Todo o processamento das amostras dos cães provenientes de área endêmica utilizados nesse

estudo, além dos testes usados no diagnóstico desses cães foram realizados como previamente descritos no capítulo 2.

2.2.2 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com a Lei Federal Brasileira de Experimentação Animal (Lei 11.794 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20072010/2008/lei/111794.htm), com as diretrizes da Fundação Oswaldo Cruz para pesquisa com animais (<http://sistemas.cpqam.fiocruz.br/ceua/hiceuaw000.aspx>) e com o manual para a vigilância e controle da leishmaniose visceral. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética comissão para a utilização de animais em pesquisa (CPqGM-FIOCRUZ. Ceua, licença N.040/2005).

2.2.3 AMOSTRAS DE BAÇO E ANÁLISES HISTOLÓGICAS

O processamento dos tecidos para análise por microscópica ótica convencional e caracterização do padrão morfológico da polpa branca esplênica foi feito conforme descrito no tópico 2.2.3 do capítulo 2. Os animais incluídos nesse estudo foram agrupados de acordo com a com os resultados dos testes diagnósticos e a organização estrutural do baço. Nesse capítulo trabalhamos com três grupos de animais que convençamos nomear por: TIPO1–SIA, cães com baço tipo 1 e não infectados ou sem infecção ativa; TIPO1–INF, com baço tipo 1 e infectado; e TIPO3–INF, com tecido esplênico tipo 3 e infectado.

2.2.4 FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DO BAÇO

Secções de baço foram submetidas a processamento imunohistoquímico utilizando os anticorpos anti-plasmócitos (anti-IgA, anti- IgG e anti-IgM). Para a identificação de plasmócitos, as secções de baço fixadas em formalina ácida e incluídas em parafina foram cortadas em lâminas previamente tratadas com Poly-L-Lisine. Em seguida as secções foram desparafinizadas em xileno, reidratados em acetona e alcoóis graduados, em seguida foi realizada uma

remoção de pigmento de formol com a solução de hidróxido de amônio (10%) em álcool 70% por 15 minutos, lavagem com água destilada e mergulho de 5 minutos em tampão PBS + Tween 20 à 0,1%. Posteriormente, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (0,5%) em metanol + PBS por 30 minutos. As lâminas foram lavadas por 3 vezes de 2 minutos com PBS e foi feita a exposição de sítios antigênicos enzimática com 0,1% de solução cálcio/tripsina por 30 minutos. Após mais lavagens, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com soro de coelho a 5% diluído em PBS para o bloqueio das reações inespecíficas. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida com os anticorpos primários anti-IgG e anti-IgM (Nordic Immunological Laboratories) diluídos em PBS. Como controle negativo, as secções foram incubadas pelo mesmo tempo com IgG de cabra (R&D Systems AB-108-C). As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário conjugado a peroxidase feito em coelho (Sigma Aldrich A5420), diluído a 1/200 em PBS. Em seguida, foi feita a revelação com solução de DAB por 5 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com água destilada e mergulhadas em PBS + Tween 20 à 0,1% por 2 minutos, mergulhadas na hematoxilina por 1 minuto, desidratadas com lavagens de água, álcool, acetona, xileno e montadas com lamínulas utilizando bálsamo do Canadá. Posteriormente, examinamos a quantidade e distribuição das diferentes populações celulares nos compartimentos esplênicos sob microscopia óptica convencional, compreendendo uma análise qualitativa das secções. Os detalhes de titulação, clone e fabricante dos anticorpos utilizados foram definidos previamente e estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5. Anticorpos específicos para marcação de plasmócitos secretores de diferentes isotipos de imunoglobulinas que foram utilizados na fenotipagem

Anticorpo	Clone	Titulação	Fabricante
Goat anti-Dog IgA	Policlonal	1/400	Nordic Lab.
Goat anti-Dog IgG	Policlonal	1/400	Nordic Lab.
Goat anti-Dog IgM	Policlonal	1/200	Nordic Lab.

2.2.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NO BAÇO

A análise morfológica das secções de tecido esplênico foi realizada conforme descrito no tópico 2.2.5 do capítulo 2.

2.2.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS DO BAÇO POR PCR EM TEMPO REAL

As expressões das citocinas BAFF, APRIL, IL6, CXCL12 e do receptor CXCR4, que são potencialmente envolvidos no processo de ativação e proliferação de linfócitos B e sobrevivência de plasmócitos, foram mensuradas através de RT-PCR em tempo real nos baços dos cães utilizados nesse estudo. Inicialmente os fragmentos dos baços congelado e mantidos no nitrogênio líquido foram cortados com auxílio de lâmina de bisturi (20 a 30 mg), em seguida descongelados e macerados para extração e purificação de RNA utilizando o Kit RNeasy (Qiagen) e a DNase RNase-free de acordo com o protocolo do proposto pelo fabricante. A quantidade e a pureza do RNA extraído foram examinadas por espectrofotometria (NanoDrop). Foi considerado indicador de pureza aceitável a razão maior ou igual 1,8 entre os valores obtidos com as mensurações utilizando as faixas de absorvância de 260 nm e 280 nm. A partir de 1 µg do RNA purificado foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) usando o sistema Superscript II Reverse Transcriptase (*Invitrogen*, Life Technologies, Estados Unidos). O cDNA obtido foi ressuspensionado em água livre de nucleases, alíquotado e estocado em freezer a -20° C. A PCR em tempo real foi feita em um volume de 20 µl de reação incluindo 5,0 µl de cDNA, 1,0 µl dos primers (4,0 µmol/µL), 4,0 µL de água livre de nuclease e 10,0 µl de SYBR Green PCR Master MIX (*Applied Biosystems*). Para cada gene de interesse, a reação foi realizada em duplicata, com controle negativo em triplicata em cada placa. Curvas padrões em triplicatas foram feitas em uma diluição seriada (1:5) a partir de um *pool* de cDNA das amostras. As concentrações de RNAm das citocinas para cada amostra foram calculadas baseadas na curva padrão e normalizadas pelas concentrações de RNAr de 18S. Todas as reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços, lidas em um termociclador com leitura de fluorescência (ABI Prims 7500) e analisadas com o software Sequence Detection System 1.1, todos fabricados pela Applied Biosystems (Foster City, CA, Estados Unidos). As seqüências dos pares de primers e as

temperaturas de anelamento (T_a) utilizadas para amplificação de cada gene de interesse estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Sequências de primers e temperatura de anelamento utilizadas na PCR em tempo real.

Primer	Forwad primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	T_a
18S	CACGGCCGGTACAGTGA AAC	CCCGTCGGCATGTATTAGCT	60°
APRIL	CTTTCACCATGGGTCAG GTGGTGTC	GACACTCAGAATATCGCCCT GGTGC	60°
BAFF	TCTTTGGGGATGAAC TGAGC	CAGAAGCTTCAATGCACC AA	55°
IL6	GGCTACTGCTTTCCTA CCC	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT	55°
CXCR4	CAGTTGAGGCTGTGGCA AAC	GAGAGCAGGTATCCAGACGC	55°
CXCL12	TCTTCGAGAGCCACATT GCC	GGGTCAATGCACACCTGTCT G	60°

2.2.7 PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE DNA DE *LEISHMANIA*

Para detecção de DNA de *Leishmania* nas amostras de baços foi realizada a extração do DNA utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Um total de 10 mg de baço foi tratado segundo o protocolo da Qiagen para tecido animal. Uma vez extraído, a qualidade e a concentração de cada amostra de DNA foi determinada utilizando um espectrofotômetro digital (NanoDrop ® ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, EUA). As amostras de DNA foram então ajustadas a uma concentração de 30 ng/ μ l, aliquotadas e armazenadas a -20°C até a realização do PCR.

A PCR em tempo real foi utilizada para determinar os valores de DNA parasitário em amostras de baço de cães. Os ensaios de PCR foram realizados utilizando um processo de amplificação previamente descrito por Francino e colaboradores, 2006. As reações foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo 5µl de amostra de DNA diluído 30 ng/mL em água deionizada, e 20 µL de mistura para PCR, contendo 12,5 µl de TaqMan Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), primer forward (Leish-1) e primer reverse (Leish-2), ambos com uma concentração final de 900nm, e uma sonda fluorogênica (Tabela 7), que foi sintetizada utilizando uma molécula repórter ligada a FAM na extremidade 5', bem como um MGB-QNQ quencher ligado à extremidade 3' (Perkin-Elmer Applied Biosystems), a uma concentração final de 200 nM. A quantificação do DNA de *Leishmania* foi realizada utilizando um método absoluto com base na comparação dos valores de ciclo limiar (CT) com os valores de uma curva padrão construída a partir de 10 diluições em série de DNA de *L. infantum*, extraído a partir de culturas de parasitas (estirpe MHOM / BR / 2000/MER2), variando de 10⁵ a 10⁻¹ parasitas, com cada diluição feita em triplicata em cada placa. A amplificação foi então realizada em triplicata para cada amostra, bem como um controle negativo, utilizando o sistema de detecção de sequência ABI Prism 5900 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Os parâmetros de ciclagem foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, e 60°C por 1 minuto.

A amplificação do gene de referência canino (18S rRNA) foi utilizada com a intenção de normalizar a concentração de DNA de cada amostra. Para amplificar o gene de rRNA 18S como uma referência interna de DNA genômico canino, reagentes TaqMan assay (Perkin-Elmer Applied Biosystems) foram utilizados. Os primers têm como alvo RNA 18S de mamíferos, e não amplificam DNA genômico de *Leishmania*. As reações foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo 5µl de amostra de DNA diluído 30ng/mL em água deionizada, e 20 µL de mistura para PCR, o qual consistia de 12,5µl de Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems), 1,25 µL de 18S GeneEx Assay (Perkin-Elmer Applied Biosystems) a uma concentração de 20 vezes, e foi adicionada água deionizada até um volume final de 25 µl. As curvas padrão foram preparadas variando de 450ng a 18,75ng, sendo cada diluição feita em triplicata em cada placa. A reação de amplificação também foi

realizada em triplicata para cada amostra, utilizando o sistema de detecção de sequência ABI Prism 5900 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Os parâmetros de ciclagem foram os mesmos utilizados na detecção e quantificação de DNA de *Leishmania*. Para cada amostra, a quantidade de genes-alvo foi determinada comparando os valores de Ct com a curva padrão apropriada. A carga parasitária foi expressa como o número de parasitas normalizados pelo valor de amplificação do gene de referência 18S em 100mg de tecido esplênico do hospedeiro.

Tabela 7. Sequência dos primers utilizados na PCR em tempo real para detecção de DNA de *Leishmania*

Primer	Sequência
Primer forward (Leish-1)	5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3'
Primer reverse (Leish-2)	5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'
Sonda	5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT -3'

2.2.8 ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS

Para qualificação e quantificação das proteínas plasmáticas foi utilizada a técnica de eletroforese, que permitiu uma avaliação aproximada das concentrações das proteínas albumina, alfa-1, alfa-2, beta e gama-globulinas nos soros dos animais dos diferentes grupos. Para essa avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas foram utilizados filmes de agarose CELMGEL, e os procedimentos foram feitos conforme indicação do fabricante. Basicamente, os soros dos animais foram descongelados e mantidos a 4°C até o momento de ser utilizado. Colocou-se 80 ml de tampão Tris pH 9,5 (CELMGEL) na cuba de eletroforese e aplicou-se 0,4 ul de cada soro no filme de agarose. Foi colocado o filme de agarose no porta-filme coincidindo os polos negativos do filme com a cuba. A corrida foi realizada por aproximadamente 20 min a 100 volts. Após a corrida eletroforética o filme foi mergulhado em 200 ml do corante Amido Black 0,1% em ácido acético a 5% e deixado por 5 minutos sem agitação. Retirou-se, então o excesso de corante do filme e incubou com 200 ml de descorante por 5 minutos. Em seguida, foi retirado o

excesso do descorante do filme e o mesmo foi colocado a 60°C (55°C a 65°C), até que ficasse completamente seco. Depois de seco o filme de agarose foi digitalizado e analisado com o software SDS-60 (Sistema para Eletroforese SE250 - CELM). As frações protéicas foram determinadas com base dos valores laboratoriais obtidos de proteínas totais de cada animal. Na Figura 17 é possível observar como os dados das frações protéicas são obtidas através do scanner e software.

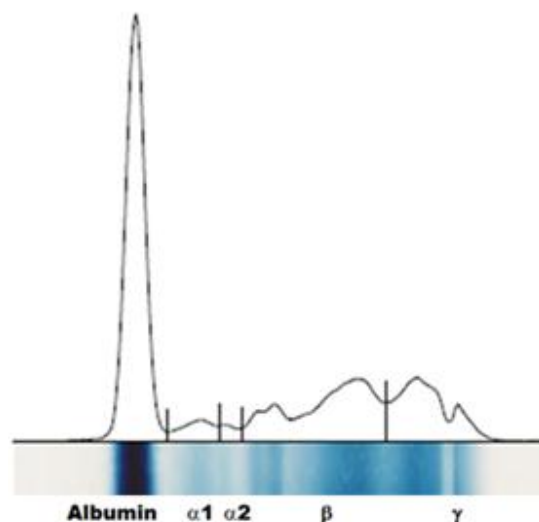


Figura 17. Frações protéicas obtidas após a eletroforese utilizando soros dos animais dos diferentes grupos.

2.2.9 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA AVALIAÇÃO DE ATIVAÇÃO POLICLONAL

Para avaliar a ativação policlonal de células B nos soros dos animais dos diferentes grupos avaliados nesse estudo, foi desenhado um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção a concentração de anticorpos da classe IgG reativos a dois diferentes antígenos: KLH (Keyhole limpet hemocyanine) e OVA (Ovoalbumina). Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 10 µg/mL de OVA e KLH em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (Na₂HCO₃ a 15 mM e NaHCO₃ a 28 mM, pH 9.6), pipetando-se 100 µL/poço, e incubando por 16 horas, a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS Tween 20 a 0,05% (agitando bem durante as lavagens), e em seguida foi realizado o bloqueio, no qual os poços receberam 200

μL /poço de PBS-T-G (Tween 20 a 0,1% e gelatina a 0,5%). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após a incubação das placas por 1 hora a 37°C, os poços foram lavados 3 vezes com PBS Tween 20 a 0,05%. Em seguida, as amostras de soro dos cães dos GRUPOS 1, 2 e 3 foram diluídas a 1:100 em PBS-T-G e foram adicionados 100 μL /poço em duplicata. Como controle negativo, poços previamente sensibilizados com os antígenos não foram incubados com soro, apenas com PBS-T-G. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida e após a incubação os poços foram lavados 3 vezes com PBS Tween 20 a 0,05%. Em seguida foi aplicado o anticorpo de coelho anti-IgG de cão conjugados a peroxidase (Sigma-Aldrich), diluídos a 1:10.000 em PBS-T-G, e foram adicionados em um volume de 100 μL /poço. As placas foram incubadas por mais 1 hora a 1 hora a 37°C e, em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T. O substrato tetrametilbenzidina (TMB; Sigma) em tampão acetato/citrato foi adicionado a 100 μL /poço [150 μL de TMB a 10mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma)], 2,91 mL de acetato de sódio 0,5 M (Sigma), 90 μL de ácido cítrico 0,5 M (Sigma), 12 mL de água destilada e 15 μL de peróxido de hidrogênio 30% P.A (Isofar, Duque de Caxias, Brasil). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μL de ácido sulfúrico 4M (Quimex, São Paulo, Brasil). A leitura da densidade óptica foi realizada a 450 nm em um espectrofotômetro (Emax Precision Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA).

2.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores dos gráficos referentes à morfometria representam médias \pm desvios padrões dos valores absolutos ou relativos das estimativas realizadas sobre a variável em questão. A análise da significância estatística entre os grupos foi determinada através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou Man-Whitney. O valor crítico para significância dos resultados foi estabelecido para $P < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando-se o programa Prisma 6.0.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA DE CÃES

Para caracterização da amostra de cães foram analisados os dados clínicos, laboratoriais e diagnósticos de todos os animais incluídos nesse estudo. Os animais do grupo TIPO1-SIA apresentaram ELISA e cultura negativos. A PCR foi, contudo positiva em 5/9 (56%) animais, ainda que com uma carga parasitária inferior àquela observada nos outros grupos. Nos animais do grupo TIPO1-INF, a cultura foi positiva em 10/16 animais (62,5%), a ELISA em 16/16 (100%) e a PCR em 15/16 (93,8%). No grupo TIPO3-INF a cultura foi positiva em 9/12 (75%), a ELISA positiva em 11/12 (91,6%) e a PCR em 12/12 (100%) (Figura 18, Tabela 8).

Os animais do grupo TIPO3-INF apresentaram carga parasitária aproximadamente 100 vezes maior que os animais do grupo TIPO1-SIA (Teste Mann-Whitney, $P < 0,05$, Tabela 8) e 20 vezes maior do que os animais do grupo TIPO1-INF.

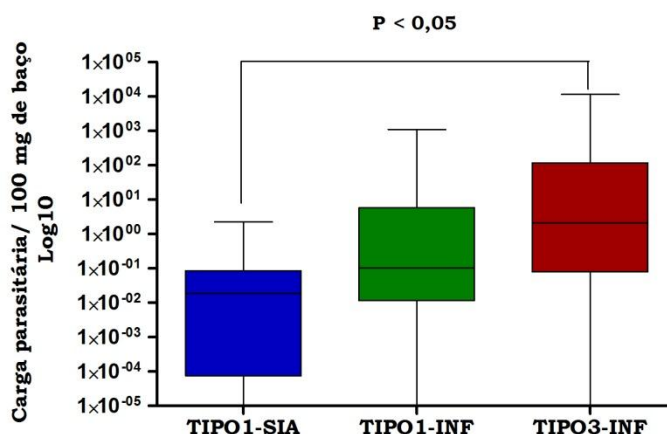


Figura 18. Caracterização clínica, laboratorial e diagnóstica dos diferentes grupos de cães. Carga parasitária analisada por PCR em tempo real (valores em Log10). TIPO1-SIA: baço organizado e sem infecção ativa; grupo TIPO1-INF: baço organizado e infectado e grupo TIPO3-INF: baço desorganizado e infectado.

Para definição da categoria clínica, foram considerados os sinais: emagrecimento, anemia (mucosa), dermatite, alopecia, conjuntivite,

onicogrifose, linfadenopatia e esplenomegalia. Foi observado que os animais do grupo TIPO3-INF apresentam mais sinais clínicos do que os animais do grupo TIPO1-SIA e TIPO1-INF (Teste Kruskal-Wallis, $P < 0,05$, Figura 19, Tabela 8).

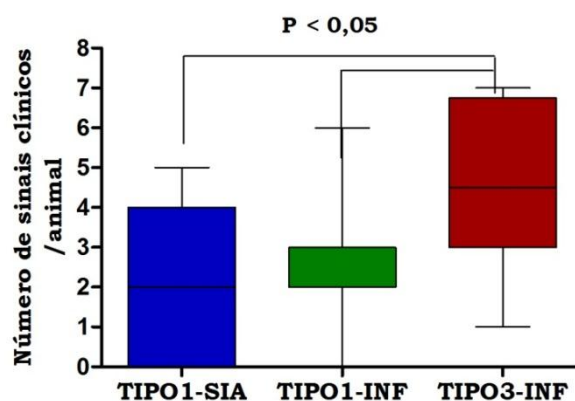


Figura 19. Caracterização clínica, laboratorial e diagnóstica dos diferentes grupos de cães. Número de sinais clínicos apresentados pelos cães dos diferentes grupos de animais.

Tabela 8. Características gerais da amostra de cães, provenientes de uma área endêmica de leishmaniose visceral, a cidade de Jequié - Brasil.

GRUPOS DE ANIMAIS				
Parâmetros positivos	TIPO1-SIA	TIPO1-INF	TIPO3-INF	SIGNIFICÂNCIA
Gênero	6M/3F	10M/6F	6M/6F	$P = 0,70^a$
Categoria Clínica				
Assintomático	3	1	0	$P < 0,05^b$
Sintomático	6	15	12	
Teste para Leishmania				
Cultura	0	10 (62,5%)	9 (75%)	$P < 0,01^b$
Sorologia	0	16 (100%)	11 (91,6%)	$P < 0,01^b$
PCR	5 (56%)	15 (93,8%)	10 (83,3%)	$P = 0,070^b$
Parasita/100 mg BAÇO				
25% Percentil	0,0001	0,0115	0,0784	$P < 0,05^c$
Mediana	0,0188	0,0965	2,0900	
75% Percentil	0,0856	4,3740	116,8000	

$a =$ teste Qui-quadrado, $b =$ Teste Kruskal-Wallis e $c =$ Teste Mann-Whitney

Esses dados sugerem que a desorganização do tecido esplênico na amostra de cães analisada esta associada com uma apresentação clínica mais grave da infecção por *Leishmania*.

4.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DOS BAÇOS DE CÃES COM LV

Na análise histológica dos baços dos animais observou-se a frequência de plasmocitose, e os achados foram classificados como: ausência de plasmocitose, plasmocitose discreta ou plasmocitose intensa. Foi observado que os animais do grupo TIPO3-INF (6/11, 55%) têm uma frequência maior de plasmocitose intensa do que os animais dos TIPO1-SIA (1/10, 10%) e TIPO1-INF (3/16, 18%), (Teste Kruskal-Wallis $P < 0,01$. Figura 20, 21).

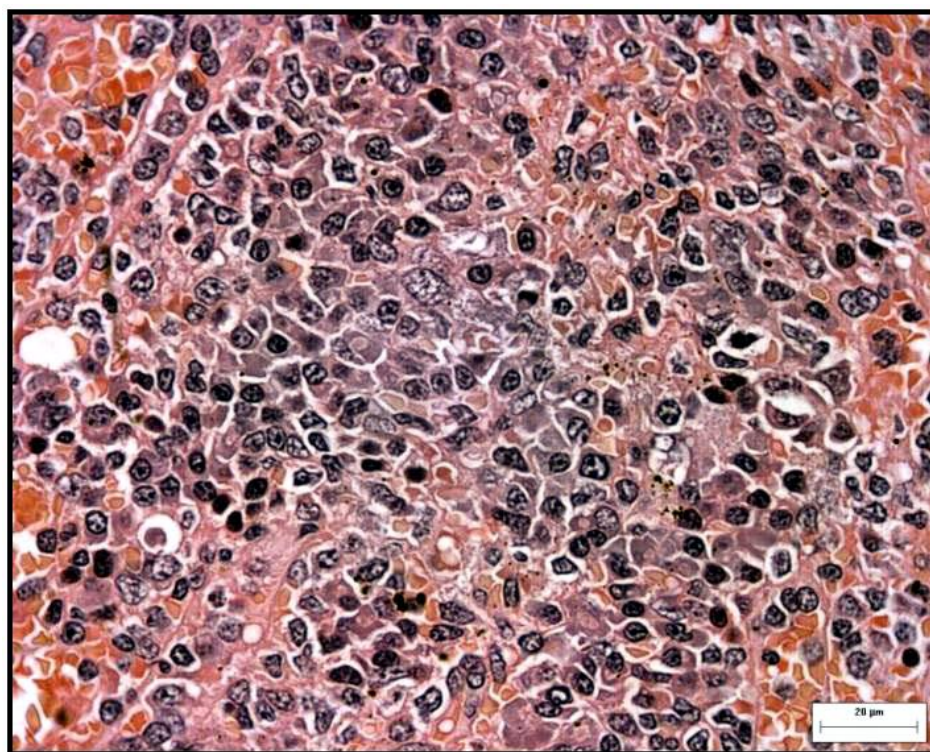


Figura 20. Plasmocitose. Microfotografia representativa de plasmocitose intensa em polpa vermelha do baço de cães de área endêmica para LV (1000X).

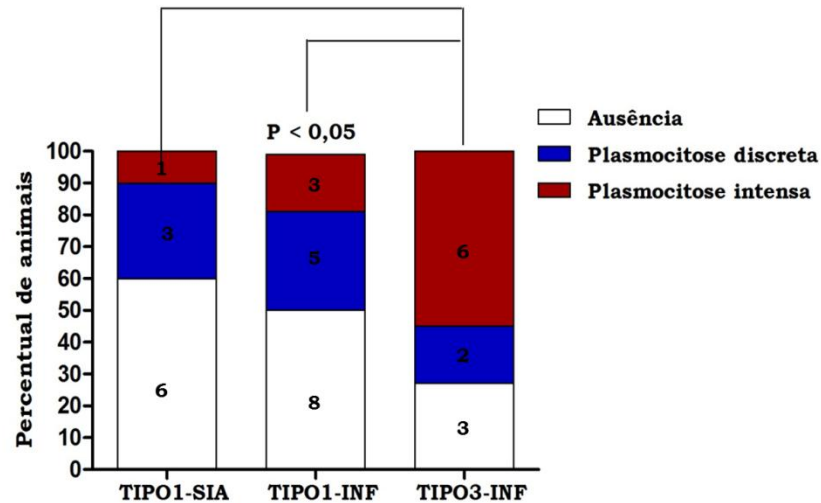


Figura 21. Avaliação semi-quantitativa de plasmocitose. Densidade relativa de plasmócitos em polpa vermelha de baço de cães de uma área endêmica para LV.

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DOS SOROS DE CÃES COM LV

Na análise bioquímica dos níveis de globulina e albumina foi observado que a razão globulina/albumina foi maior em animais do grupo TIPO3-INF (razão G/A = 3) do que em animais dos grupos TIPO1-SIA e TIPO1-INF (razão G/A = 1,7 em ambos) demonstrando uma forte inversão da relação albumina globulina típica da LV (Figura 22).

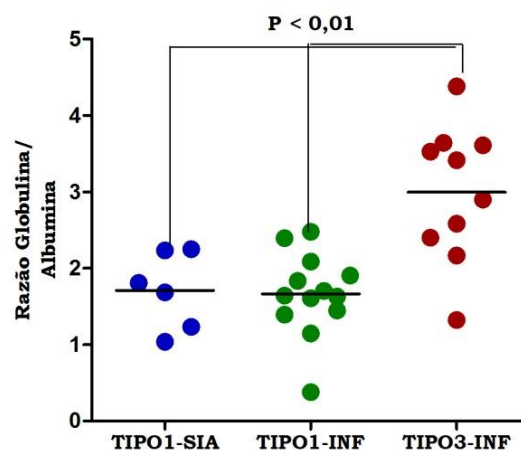


Figura 22 Razão globulina/albumina. Resultados das análises bioquímicas dos soros dos cães de uma área endêmica para LV

4.4 DISTRIBUIÇÕES DAS POPULAÇÕES CELULARES DO BAÇO

4.4.1 ANÁLISE QUALITATIVA DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR

A distribuição das populações de plasmócitos foi similar entre os baços dos animais com baço organizado ou desorganizado. Houve, porém diferenças quantitativas na distribuição dessas células nos diferentes compartimentos do baço. Neste item descreveremos apenas em linhas gerais a distribuição das ocupações celulares nos compartimentos:

Plasmócitos secretores de IgG - se encontravam preferencialmente em torno da região periarteriolar e em densos agregados na polpa vermelha. Raramente se observa em região de foliculo (Figura. 23).

Plasmócitos secretores de IgM - se encontram principalmente delimitando, de forma rendilhada, a região da Zona Marginal. Encontram-se também em torno de região periarteriolar. Na polpa vermelha formam finos agregados (Figura. 24).

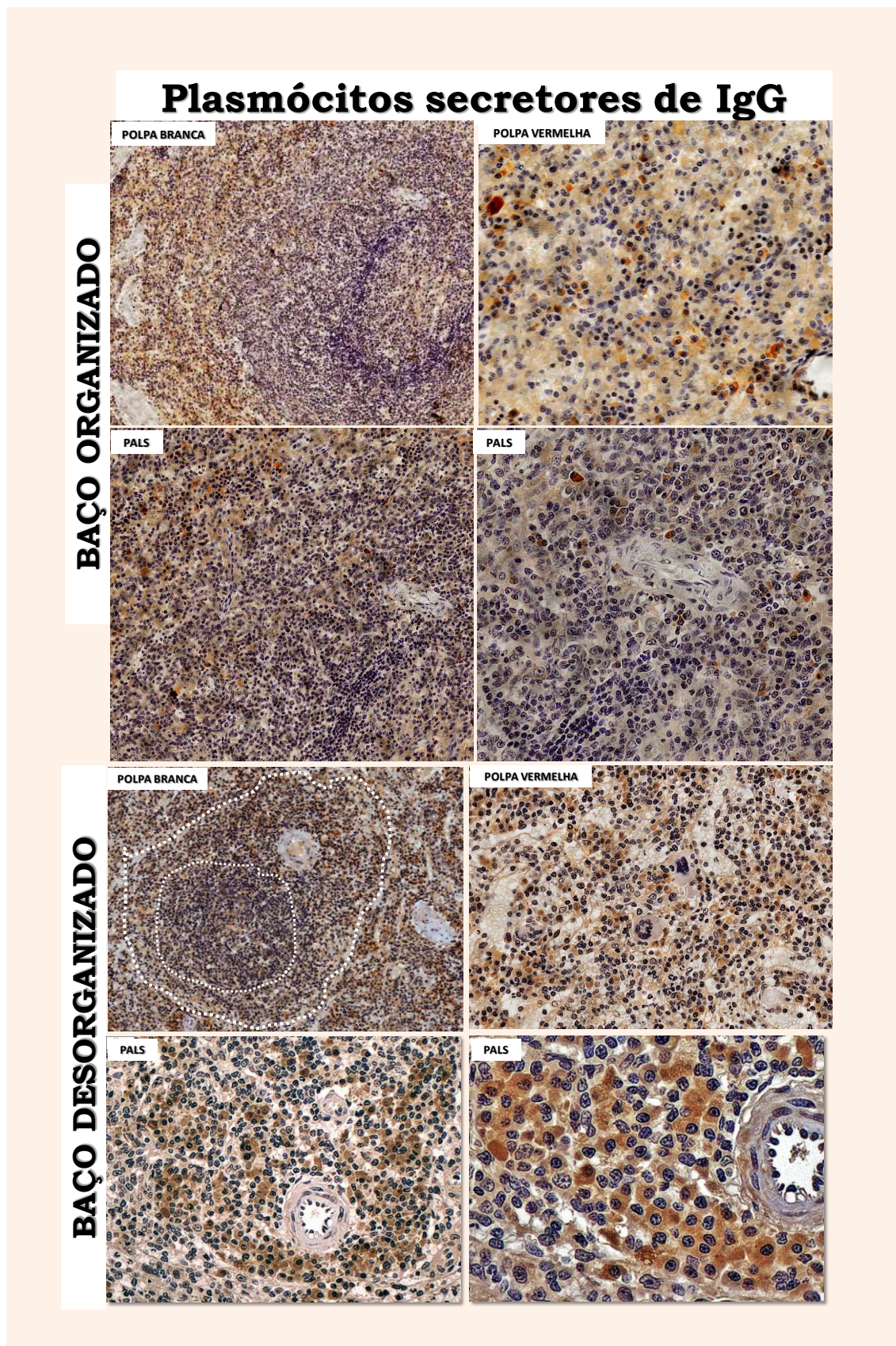


Figura 23 Distribuição de plasmócitos secretores de IgG. Microfotografias representativas dos tecidos esplênicos organizados e desorganizados marcados com anticorpo específico (200X e 400X)

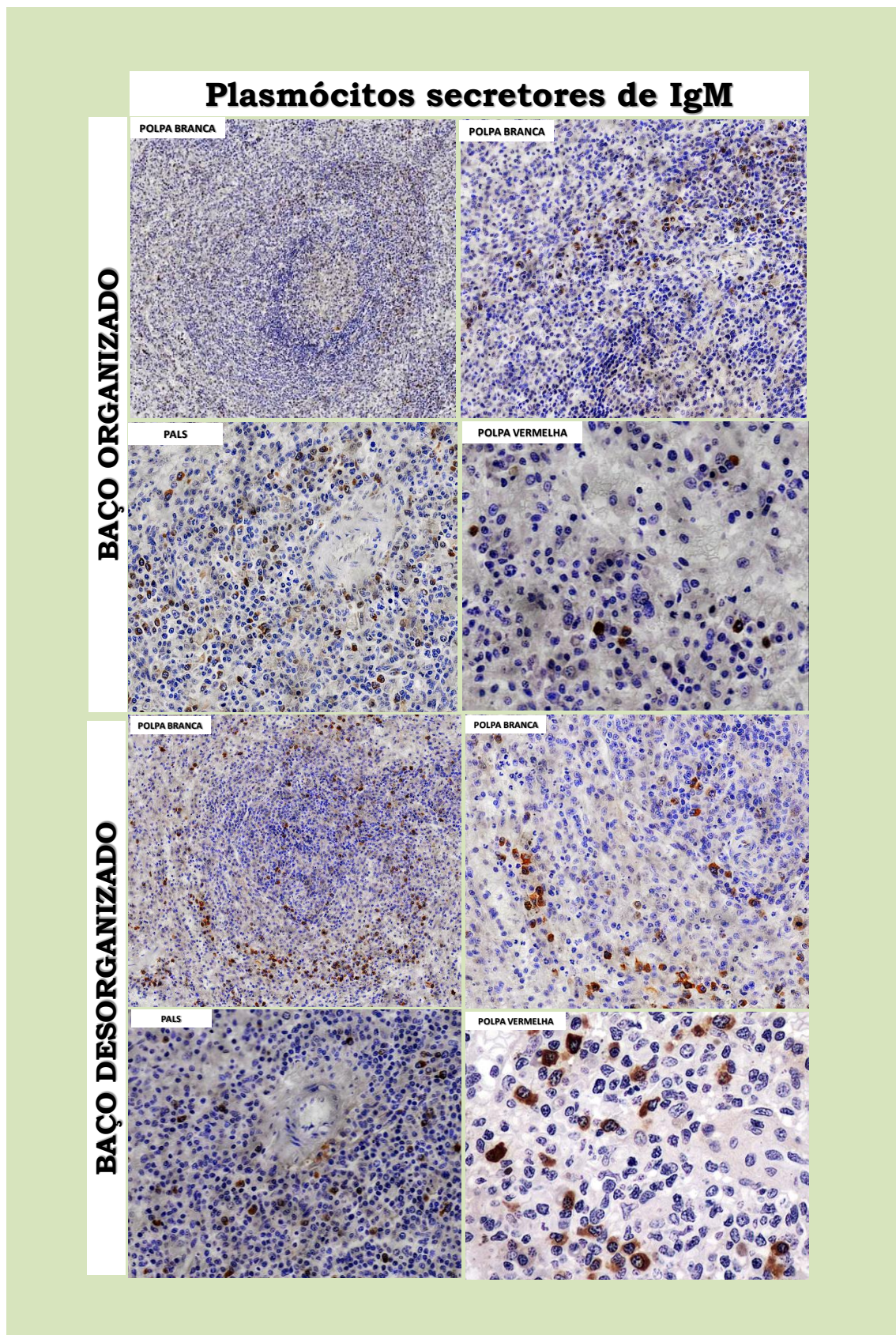


Figura 24. Distribuição de plasmócitos secretores de IgM. Microfotografias representativas dos tecidos esplênicos organizados e desorganizados marcados com anticorpo específico (200X e 400X).

4.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS QUANTITATIVAS

4.5.1 DENSIDADE CELULAR

A densidade de plasmócitos secretores de IgG foi maior na região PALS que nos outros compartimentos do tecido esplênico em animais com tecido linfóide organizado ou desorganizado. Houve um aumento da densidade de plasmócitos IgG⁺ nos animais do grupo TIPO3-INF quando comparados com os animais dos grupos TIPO1-SIA e TIPO1-INF. A densidade celular da PV foi maior nos animais do grupo TIPO3-INF (743,1 ± 126,8 células/mm²) do que nos TIPO1-SIA (198,2 ± 53 células/mm²) e TIPO1-INF (168,2 ± 68 células/mm²), essa diferença foi estatisticamente significativa (P < 0,05, Teste Mann-Whitney, Figura 25, Tabela 9).

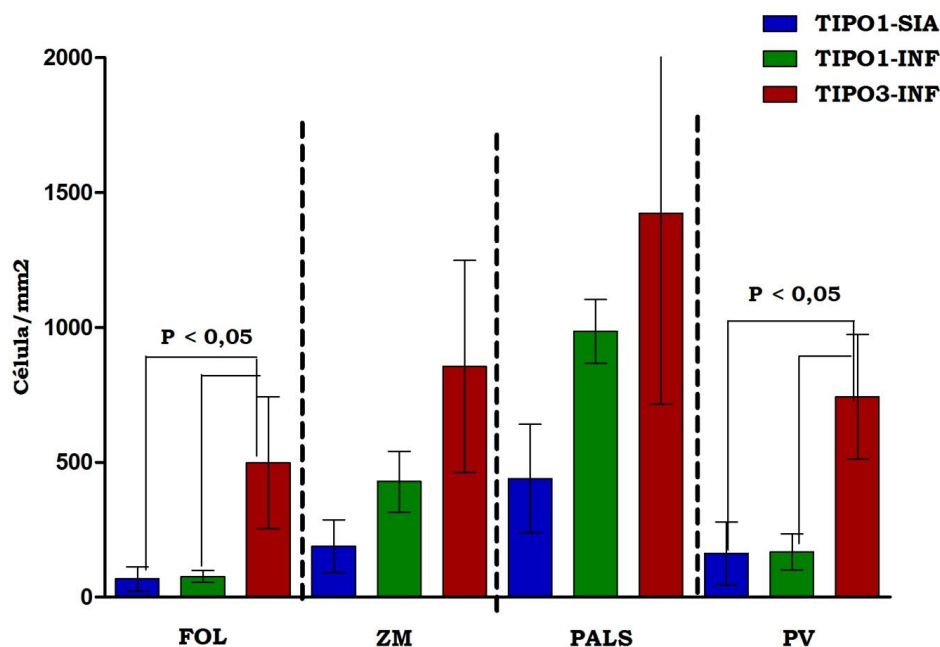


Figura 25. Densidade de plasmócitos secretores de IgG. Número células IgG⁺ por mm² nos diferentes compartimentos do baço de animais com tecido esplênico organizado e desorganizado. FOL = foliculo, ZM = zona marginal e PALS = região periarteriolar e PV = polpa vermelha.

Tabela 9. Densidade de células IgG⁺ (plasmócitos secretores de IgG) nos diferentes compartimentos esplênicos de cães de uma área endêmica para LV

Densidade celular (células IgG⁺/mm²) ± Desvio Padrão				
Animais	Compartimentos do baço			
	FOL	ZM	PALS	PV
TIPO1-SIA	198 ± 132	350 ± 83	860 ± 694	192 ± 53
TIPO1-INF	116 ± 109	428 ± 178	985 ± 938	168 ± 68
TIPO3-INF	498 ± 326	855 ± 202	1423 ± 507	743 ± 126

FOL = Foliculo; ZM = Zona Marginal; PALS = Periarteriolar; PV = Polpa Vermelha

A densidade média de plasmócitos secretores de IgM foi aparentemente maior na região PALS dos animais do grupo TIPO3-INF (129 ± 72 células/mm²) do que nos animais do TIPO1-SIA (75 ± 35 células/mm²) e TIPO1-INF (71 ± 40 células/mm²) no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Observou-se também um aparente aumento da densidade células IgM⁺ no FOL, ZM e PV dos animais do grupo TIPO3-INF quando comparados com os animais de baço TIPO1-INF ou TIPO1-INF no entanto essas diferenças também não foram estatisticamente significantes (Figura 26, Tabela 10).

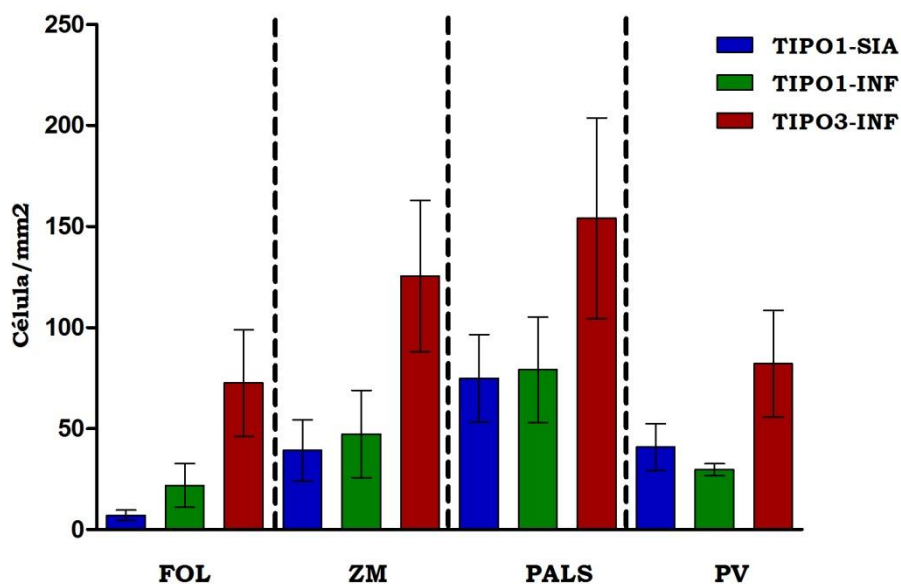


Figura 26. Densidade de plasmócitos secretores de IgM. Número células IgM+ por mm² nos diferentes compartimentos do baço de animais com tecido esplênico organizado e desorganizado. FOL = folículo, ZM = zona marginal e PALS = região periarteriolar e PV = polpa vermelha. Cada ponto representa um animal.

Tabela 10. Densidade de células IgM+ (plasmócitos secretores de IgM) nos diferentes compartimentos esplênicos de cães de uma área endêmica para LV

Densidade celular (células IgM+/mm ²) ± Desvio Padrão				
Animais	Compartimentos do baço			
	FOL	ZM	PALS	PV
TIPO1-SIA	7,1 ± 5,6	39,1 ± 14,7	74,8 ± 35,5	40,8 ± 19,2
TIPO1-INF	26,9 ± 21,0	45,5 ± 19,0	71,1 ± 40,9	33,7 ± 18,1
TIPO3-INF	68,5 ± 62,0	102,3 ± 43,5	129,7 ± 72,0	82,5 ± 32,4

FOL = Folículo; ZM = Zona Marginal; PALS = Periarteriolar; PV = Polpa Vermelha

4.5 PERFIS ELETROFORÉTICOS DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

O perfil eletroforético das proteínas séricas mostrou uma diminuição significativa da fração de albumina nos animais do grupo TIPO3-INF (22,6% de albumina) em comparação com aqueles animais do grupo TIPO1-SIA (39% de albumina). Essa diferença foi estatisticamente significativa (Teste Kruskal-Wallis $P < 0,01$, Figura 27).

Há um aumento significativo da fração de gama-globulina sérica nos animais do TIPO3-INF (38,6%) comparado com a fração dos animais do grupo TIPO1-SIA (19,3%), essa diferença foi estatisticamente significativa (Teste Kruskal-Wallis $P < 0,01$, Figura 27).

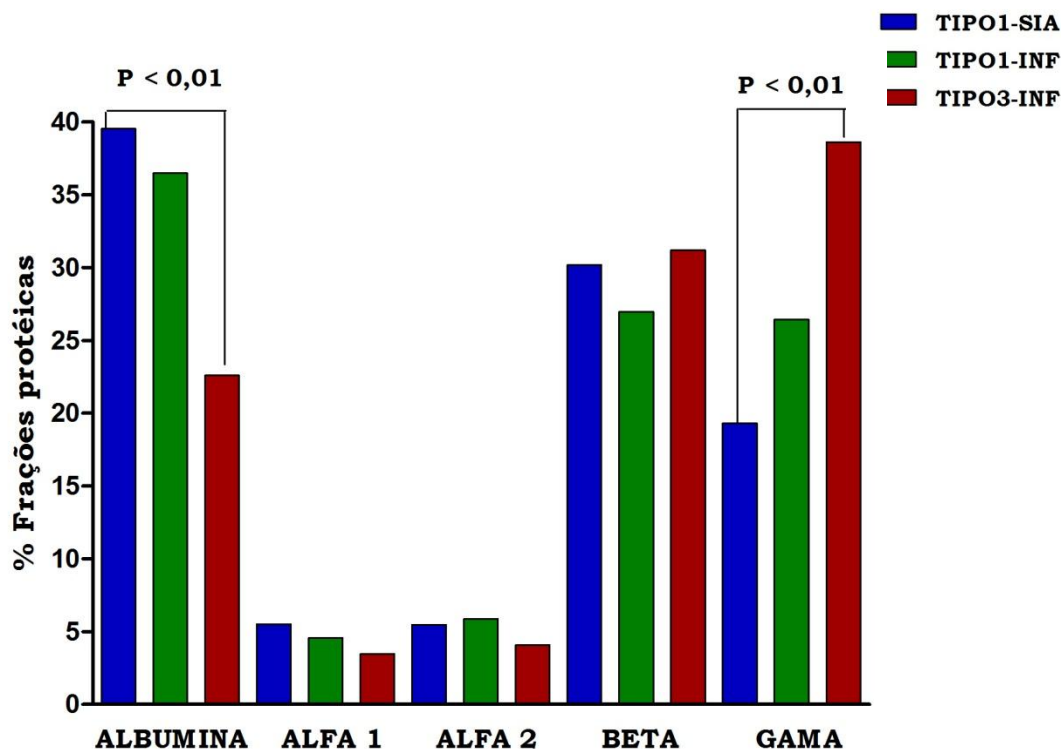


Figura 27. Porcentagens das diferentes frações proteicas presentes no soro dos cães de uma área endêmica para LV.

4.6 RESPOSTA INESPECÍFICA DE IGG CONTRA ANTÍGENOS PROTÉICOS

Avaliando a atividade de anticorpos séricos da classe IgG reativos aos dois diferentes antígenos proteicos usados nesse estudo, foi verificado que houve tendência ao aumento da atividade sérica tanto de anticorpos IgG anti-KLH quanto de anticorpos IgG anti-OVA nos soros dos animais do grupo TIPO3-INF quando comparados com os outros dois grupos de animais, essa diferença contudo não foi estatisticamente significativa.

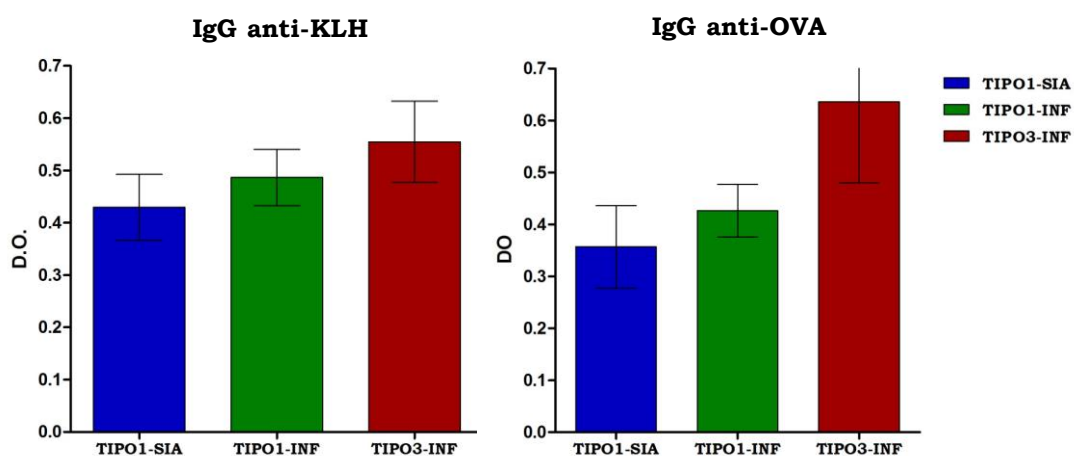


Figura 28. Concentrações séricas de anticorpos específicos da classe IgG produzidos contra diferentes antígenos proteicos (KLH e OVA) quando incubados com soros dos animais dos três grupos analisados nesse estudo.

4.7 EXPRESSÕES DE CITOCINAS DO BAÇO DE CÃES

A avaliação da expressão de citocinas no baço dos cães mostrou que a expressões da quimiocina CXCL12 e das citocinas BAFF e APRIL foram maiores em baços de animais do grupo TIPO3-INF do que em animais do grupo TIPO1-INF e do grupo TIPO1-SIA. Essas diferenças foram estatisticamente significantes (Teste Mann-Whitney, $P < 0,05$). Não

houve diferença estatística entre os grupos de animais, na expressão do receptor de quimiocina, CXCR-4, nem da citocina IL-6 apesar de haver uma clara tendência de maior expressão nos animais do grupo TIPO3-INF (Figura 29).

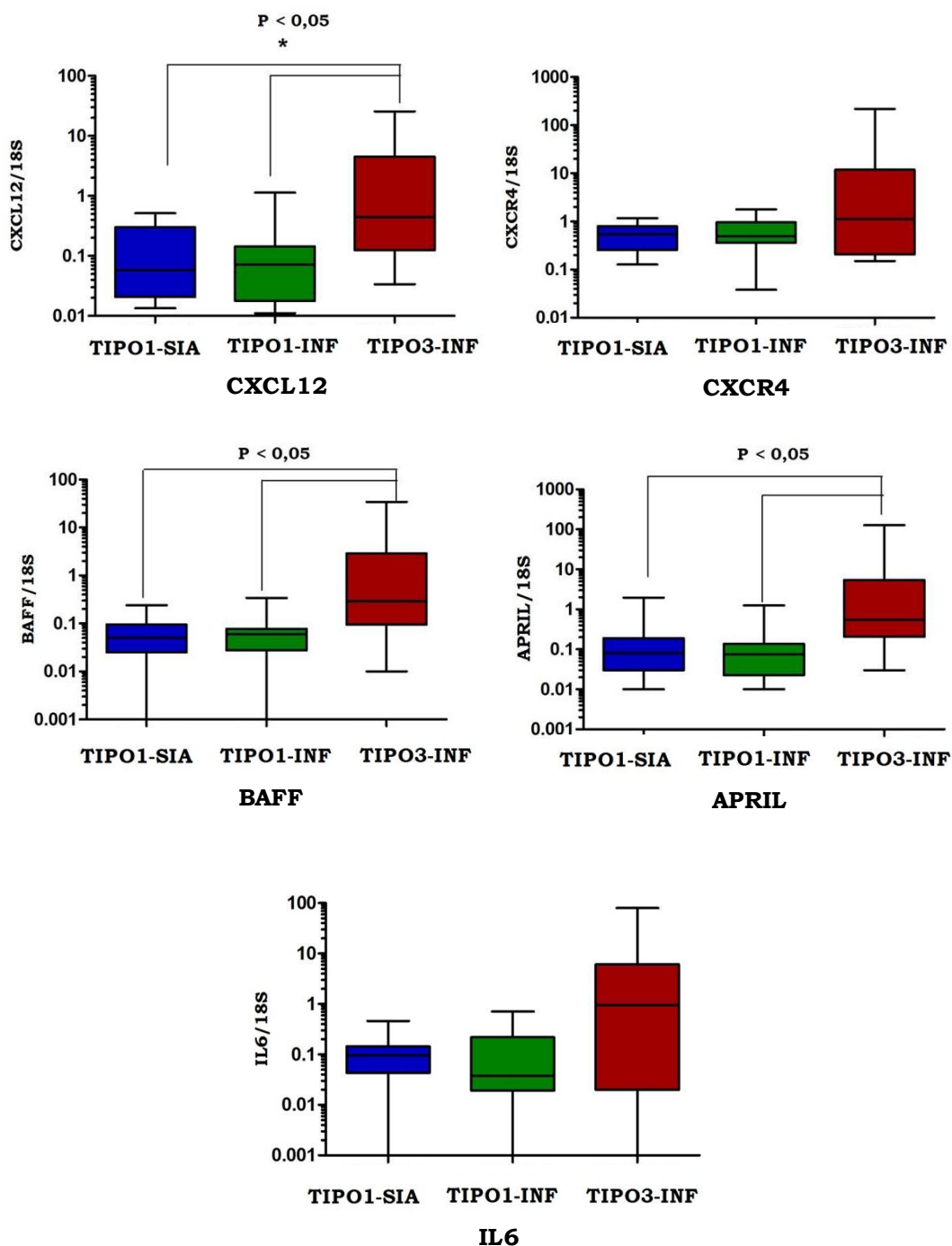


Figura 29. Expressão dos RNAm de citocinas em baços organizados e desorganizado, relativo a expressão de 18S, expresso em Log10. Teste Mann-Whitney, $P < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado que a desorganização do tecido linfóide esplênico em cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral está associada com uma plasmocitose intensa no baço, especialmente de plasmócitos produtores de IgG, com a expressão anômala de citocinas potencialmente envolvidas na ativação e *homing* dessas células além de disglobulinemia e hipergamaglobulinemia.

A ocorrência de plasmocitose em leishmaniose visceral já foi descrita em análises histológicas de baços humanos (VERESS *et al*, 1977), em modelos experimentais com camundongos (PREMVATI 1979) e em cães (CORBEIL *et al*, 1976, MARTINEZ-MORENO *et al*, 1995; SANTANA *et al*, 2008). Em um estudo prévio do nosso grupo a frequência de plasmócitos foi maior no grupo de cães com evidência de infecção por *Leishmania* do que nos cães não infectados (Santana *et al*, 2008). Corroborando esses achados, no presente estudo, descrevemos plasmocitose no baço de cães naturalmente infectados com elevada carga parasitária e número de sinais clínicos associadas com a desorganização da polpa branca esplênica.

Corbeil e colaboradores (1976) observaram substituição de praticamente todos os linfócitos B da polpa vermelha por plasmócitos, associado com uma dispersão de macrófagos carregados de *Leishmania*. Em nosso estudo, o grupo de animais que tinha uma maior carga parasitária no baço estimada através de PCR em tempo real apresentou também mais frequentemente plasmocitose intensa.

Aqui nós refinamos os achados de plasmocitose em leishmaniose visceral avaliando a distribuição e densidade de plasmócitos produtores de diferentes isotipos de imunoglobulinas em todos os compartimentos esplênicos. Vimos que apesar de a plasmocitose ocorrer de forma generalizada no baço, há um aumento da densidade dessas células nas

regiões periarteriolar e polpa vermelha de animais com tecido linfóide esplênico desorganizado. A maior parte dos plasmócitos presentes no baço desses animais foram do isotipo IgG, e apesar de não ser estatisticamente significante, também foi observado uma tendência de aumento na densidade de plasmócitos do isotipo IgM nos diferentes compartimentos dos baços desses animais.

Alguns aspectos típicos da leishmaniose visceral como a ativação policlonal de células B pode contribuir para a diferenciação de plasmócitos e sua retenção no baço (GALVAO-CASTRO *et al.* 1984; CAMPOS-NETO *et al.* 1982). Campos-Neto e colaboradores (1982) observaram por meio de uma infecção experimental com *Leishmania donovani* em hamsters, altos níveis de gamaglobulinas caracterizando a hipergamaglobulinemia. Sabe-se que esses altos níveis de gamaglobulina são causados pela ativação policlonal de linfócitos B. Hipergamaglobulinemia também foi descrita em calazar humano (LLOYD AND PAUL, 1928 apud CAMPOS-NETO *et al.*, 1982; GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1984) e maior parte dessas gamaglobulinas não são anticorpos específicos para o parasito, mas são atribuídos a uma atividade sintética contínua do sistema linforeticular alterado e hipertrofiado visto na leishmaniose visceral (CAMPOS-NETO *et al.*, 1982; (ZUCKERMAN 1975).

No presente trabalho com cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, observou-se que aqueles animais que apresentavam desorganização do tecido linfóide esplênico, apresentavam também maiores níveis de IgG sérica contra dois antígenos protéicos, KLH e OVA, além de um aumento significante da gamaglobulina sérica, demonstrando a importante ativação policlonal e hipergamaglobulinemia associado ao comprometimento linfóide esplênico. Em um trabalho com pacientes com LV a ocorrência de ativação de células B policlonais foi sugerida devido ao aumento acentuado dos níveis de IgG e IgM do soro e a presença de anticorpos

contra várias proteínas incluindo KLH (GALVÃO-CASTRO et al, 1983), concordando com os achados do nosso estudo.

Alguns autores acreditam também na associação entre essa ativação e o número de parasitos no baço, porém os mecanismos pelos quais a *Leishmania* induz essa ativação policlonal não são completamente compreendidos, mas parece ser claro que os componentes desse parasito modulam a resposta imune do hospedeiro (CAMPOS-NETO et al, 1982). Em concordância com esses autores, em nosso estudo, aqueles animais que apresentam desorganização do tecido linfóide esplênico e plasmocitose, também são aqueles que apresentam uma carga parasitária significativamente maior.

Plasmocitose também tem sido amplamente descrito em outras infecções, como pelo vírus da imunodeficiência humana (CORBEIL *et al.*). O estudo de Nagase e colaboradores em 2001 demonstrou que em pacientes com HIV há o estímulo de células B de memória CD27 promovendo sua diferenciação em plasmócitos, resultado também em um elevado nível de Ig sérica (NAGASE *et al.* 2001).

Sabemos que plasmócitos não são células que normalmente migram de tecido para tecido, e por isso eles estão situados nos órgãos de forma que o anticorpo produzido por eles entrem facilmente na circulação. No baço, que é nosso órgão de interesse, geralmente os plasmócitos são detectados entre as células reticulares da polpa vermelha que é rico em vasculatura facilitando a circulação do anticorpo (LIU *et al.* 1991)). Nós observamos o acúmulo de plasmócitos na polpa vermelha e nas regiões periarteriolas de cães com LV, facilitando com isso a liberação massiva dos células produtores de anticorpos na corrente sanguínea, responsáveis pelos altos títulos de imunoglobulinas séricas nesses cães.

Células B imaturas deixam a circulação para entrar no baço e completar seu desenvolvimento em células B maduras *naive*. No baço,

as células B podem encontrar o antígeno, e serão então ativadas e diferenciadas em células B de memória, plasmócitos ou plasmablastos. Dois acontecimentos estão ligados à ativação de células B: diferenciação em plasmócitos de vida curta ou formação de centro germinativo e geração de plasmócitos de vida longa (HO *et al.* 1986). De uma forma generalizada há um predomínio de plasmócitos de vida curta em órgãos linfóides enquanto aqueles de vida longa são detectados mais freqüentemente medula óssea. Entretanto algumas células de vida longa permanecem em órgãos linfóides secundários (MINGES WOLS *et al.* 2002).

Estudos do nosso grupo com cães naturalmente infectados por *Leishmania* têm descrito que há uma desorganização da polpa branca do baço, com perda de centro germinativo e diminuição da população de células B associada principalmente a uma diminuição da expressão da quimiocina CXCL13 (SANTANA *et al.*, 2008). Vemos com mais detalhes nesse estudo que essas células B parecem ser substituídas por plasmócitos dos isotipos IgG e IgM, resultando em plasmocitose.

Já é bem estabelecido que plasmócitos presentes em órgãos linfóides são predominantemente plasmócitos de vida curta. No entanto, em condições patológicas inflamatórias crônicas, como no caso da leishmaniose visceral, não está claro quais seriam os fatores que contribuiriam para a permanência de plasmócitos no baço por longos períodos de tempo. Estaria havendo um prolongamento da vida desses plasmócitos de vida curta no baço ou na verdade uma retenção de células no baço que teoricamente deveriam migrar para a medula óssea onde se estabeleceriam como plasmócitos de vida longa?

Muitos trabalhos têm demonstrado que a produção de citocinas e quimiocinas pode contribuir para a diferenciação de plasmócitos e sua retenção na polpa vermelha na leishmaniose visceral (HARGREAVES *et al.*, 2001; DE LIMA *et al.* 2007; POECK *et al.* 2004).

Os plasmócitos de vida longa parecem depender da sua interação com células estromais e fatores derivados de células estromais para sobrevivência e manutenção na medula óssea. Células estromais produzem IL-6 que é crítico para a sobrevivência de plasmócitos. A IL-6 está diretamente envolvida na patogênese policlonal de plasmócitos e também tem sido reportada por contribuir para ativação de células B e/ou diferenciação para plasmócitos (NAGASE *et al.* 2001). No estudo de Lima e colaboradores observou-se uma elevada expressão de IL-6 em cães infectados com doença ativa (DE LIMA *et al.* 2007). No nosso trabalho, observamos uma clara tendência de aumento na expressão de IL-6 em baços de animais naturalmente infectados com desorganização do tecido esplênico e com plasmocitose, mostrando uma possível correlação com a plasmocitose vista nesses animais.

Evidências indicam que a quimiocina CXCL12, produzida por células estromais da polpa vermelha do baço ou da medula óssea, têm um papel muito importante na regulação de plasmócitos e seu posicionamento no baço (HARGREAVES *et al.*, 2001). Por isso acreditamos que a superexpressão dessa quimiocina, como observada nesse estudo pode estar diretamente relacionado com a retenção de plasmócitos no baço.

Sabe-se que a capacidade de plasmócitos se tornarem plasmócitos de vida longa está ligada a sua habilidade de fazer o *homing* para os nichos de células estromais que produzem moléculas críticas (CXCL12) para a sobrevivência de plasmócitos óssea (FAIRFAX *et al.* 2008). Em condições normais, o nicho de *homing* dos plasmócitos de vida longa é a medula óssea, no entanto no contexto da leishmaniose visceral canina é observado plasmocitose não somente na medula óssea (dado não mostrado) como também no baço, onde foi observada a alta expressão de CXCL12 no grupo de animais infectados com *Leishmania* e com desorganização do tecido linfóide esplênico.

Já é bem estabelecido o papel de citocinas da superfamília TNF, BAFF e APRIL na sobrevivência, maturação e diferenciação de células B (KALLED 2005, MACKAY *et al.* 2003). Um trabalho por Chu e colaboradores (2009) mostrou que as expressões de RNAm de BAFF e APRIL são particularmente altas em plasmócitos. Logo, pelo fato de plasmócitos secretarem BAFF e APRIL biologicamente ativos eles podem contribuir para alta frequência de plasmócitos, provendo dessa forma, uma fonte local constante de fatores de crescimento para essas células. Nossos achados corroboram esses dados, demonstrando que a alta frequência de plasmócitos está fortemente associada com uma elevada expressão de RNAm das citocinas BAFF e APRIL nos baços de cães infectados e com tecido esplênico desorganizado (CHU *et al.*, 2009).

Finalmente, com base nesse trabalho, vimos que a manutenção de plasmócitos no baço de cães com LV, levando a uma plasmocitose importante, está associada a uma hipergamaglobulinemia e diglobulinemia e tem forte influência de uma mudança coordenada da expressão de quimiocinas e citocinas nos baços desses cães com desorganização do tecido linfóide esplênico.

CAPÍTULO 4

IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE IMUNOGLOBULINA NA LINHAGEM GERMINATIVA DO GENOMA CANINO

1. INTRODUÇÃO

Vimos no capítulo 2 e 3 desta tese que a desorganização do tecido linfoide esplênico associada à leishmaniose visceral canina cursa com perda de centro germinativo e diminuição da população de células B e células dendríticas foliculares associada a plasmocitose.

Essa plasmocitose pode decorrer de ativação específica ou inespecífica policlonal e pode incluir elementos como a diferenciação extra-folicular de células B. Apesar da importância dos centros germinativos para algumas etapas da diferenciação de linfócitos B, como a troca de isotipo de imunoglobulina, esta etapa do desenvolvimento celular pode ocorrer em menor intensidade fora do folículo. Essa diferenciação anômala de linfócitos B pode ter seu efeito intensificado pela superexpressão das citocinas BAFF/APRIL e da quimiocina CXCL12 resultando no aumento da sobrevivência e retenção de plasmócitos na polpa vermelha (HARGREAVES et al, 2001; DE LIMA et al, 2007; POECK et al, 2004).

Para definir melhor os possíveis mecanismos de acumulação de plasmócitos no baço na leishmaniose decidimos estudar (1) o repertório de células B e plasmócitos (2) a relação clonal entre plasmócitos produtores de diferentes isotipos de imunoglobulina, e (3) os genes de imunoglobulina que estão expressos diferencialmente em populações de linfócitos B no baço de cães de uma área endêmica para LV com e sem desestruturação linfoide.

As diversidades nos repertórios de células B e plasmócitos podem ser investigadas por análise dos genes da cadeia pesada da imunoglobulina (IGH) (DUNN-WALTERS, BOURSIER, *et al.* 1997; DUNN-WALTERS, ISAACSON, *et al.* 1997, WU *et al.* 2010). O estudo dos rearranjos dos segmentos gênicos variáveis (VH), de diversidade (DH) e de junção (JH) da imunoglobulina é essencial para avaliação dessa diversidade.

As regiões variáveis da imunoglobulina apresentam sequências conhecidas como região determinadora de complementariedade (CDR3) onde se encontra a maioria das variações. Já foi demonstrado que células que possuem a mesma sequência CDR3 são provenientes de um único clone, que pode ter sido amplificado durante uma resposta do centro germinativo (KUPPERS *et al.* 1993).

Alguns autores têm analisado a diversidade de células B e plasmócitos em órgãos linfóides e em sangue periférico utilizando técnicas de biologia molecular como RT-PCR e sequenciamento (DUNN-WALTERS *et al.* 2000; WU *et al.* 2010). Nesses estudos as regiões CDR3 de diferentes células foram comparadas para identificar aquelas que são relacionadas. Além disso, as sequências gênicas encontradas podem ser comparadas com as sequências de genes de imunoglobulina da linhagem germinativa para se determinar, por exemplo, a extensão da hipermutação somática (WU *et al.* 2010, DUNN-WALTERS *et al.* 1996).

Para a análise o repertório de células B e plasmócitos no tecido linfóide de cães com leishmaniose é necessário utilizar um banco de genes de imunoglobulina na linhagem germinativa canina como referência. Em um estudo realizado por Bao e colaboradores (2010), foi feita a caracterização do repertório de genes da cadeia pesada da imunoglobulina, no entanto esses autores encontraram um número limitado de genes VH, JH e DH. Por isso surgiu-nos o interesse em fazer um estudo ampliado buscando identificar um número maior de genes para a nossa biblioteca de referência (BAO *et al.* 2010).

Dessa forma, neste capítulo apresentamos uma análise do DNA do genoma canino buscando identificar o maior número possível de genes de imunoglobulina na linha germinativa. Com essa análise foi possível construir uma biblioteca de genes caninos para ser usada como referência em experimentos futuros usando técnicas de biologia molecular avançadas, como o seqüenciamento *high throughput* para

identificação, por exemplo, das regiões CDR3 de genes de imunoglobulina caninas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CRITÉRIOS PARA BUSCA DOS SEGMENTOS IGVH, IGDH E IGJH NA LINHAGEM GERMINATIVA CANINA

O genoma canino que se encontra disponível em um banco de dados de acesso público foi usado para a busca da sequência que codifica o *locus* da cadeia pesada da imunoglobulina (*Canis lupus familiaris* chromosome 8 genomic scaffold. NW_003726071.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/357579560?report=genbank&to=72170317, Figura 1).

Para identificar os genes VH na linhagem germinativa canina, foram realizadas buscas utilizando-se como critério a sequência TATTACTGT, que compreende o início da região determinadora de complementariedade 3 (CDR3) e parte da sequência de recombinação de sinal (RSS), CACAGTG.

As sequências DH selecionadas como parte da biblioteca de genes, contêm CACAGTG ou suas derivações CACTGTG, CACGGTG e CAGTGTG, que são parte da RSS. Essas derivações da região RSS foram testadas com base nas similaridades com as sequências presentes nos genes DH humanos (LEFRANC *et al*, 2001).

Para seleção dos genes JH foi realizada buscas das sequências CTGGGGGCC situados após as sequências conservadas de recombinação de sinal (RSS).

Foi utilizado software de análise de DNA, o Lasergene® SeqMan Pro (DNASTAR) nessa etapa de busca.

2.2 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

As sequências obtidas foram salvas em arquivos individuais para serem analisadas e manipuladas através do Lasergene® EditSeq (DNASTar).

Foi utilizado o programa Lasergene® MegAlign (DNASTar) e Clustal W para alinhar os genes e analisar as múltiplas sequências alinhadas.

As designações das regiões frameworks (FW) e das regiões determinantes de complementariedade (CDR) foram feitas através da análise das sequências no IMGT, The International ImmunoGenetics Information System® (<http://www.imgt.org>) (Figura 30).

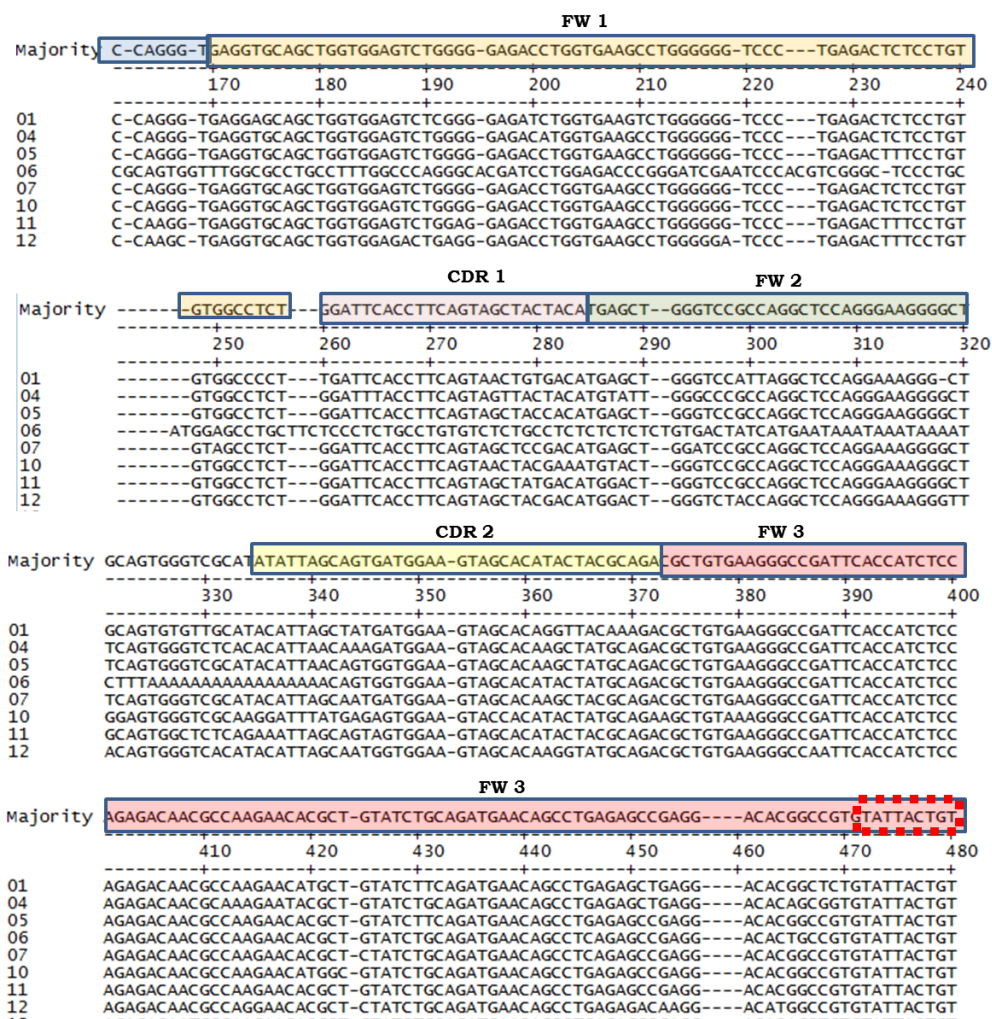


Figura 30. Exemplo das seqüências selecionadas alinhadas. As regiões variáveis da imunoglobulina canina (FW1, CDR1, FW2, CD2, FW3) estão destacadas. No quadro em vermelho, a seqüência TATTACTGT (final da FW3) que foi utilizada na busca.

2.3 DEFINIÇÕES DAS FAMÍLIAS DE GENES IGHV

Os genes IGHV foram divididos em família baseados nas similaridades dos seus nucleotídeos. O critério utilizado para que genes fossem definidos como da mesma família foi uma similaridade de no mínimo 75% de acordo com Lefranc e colaboradores (2001).

A árvore filogenética foi construída através do programa Lasergene® MegAlign (DNASTar), através da qual foi possível definir as posições do genes pertencentes a uma mesma família (Figura 31).

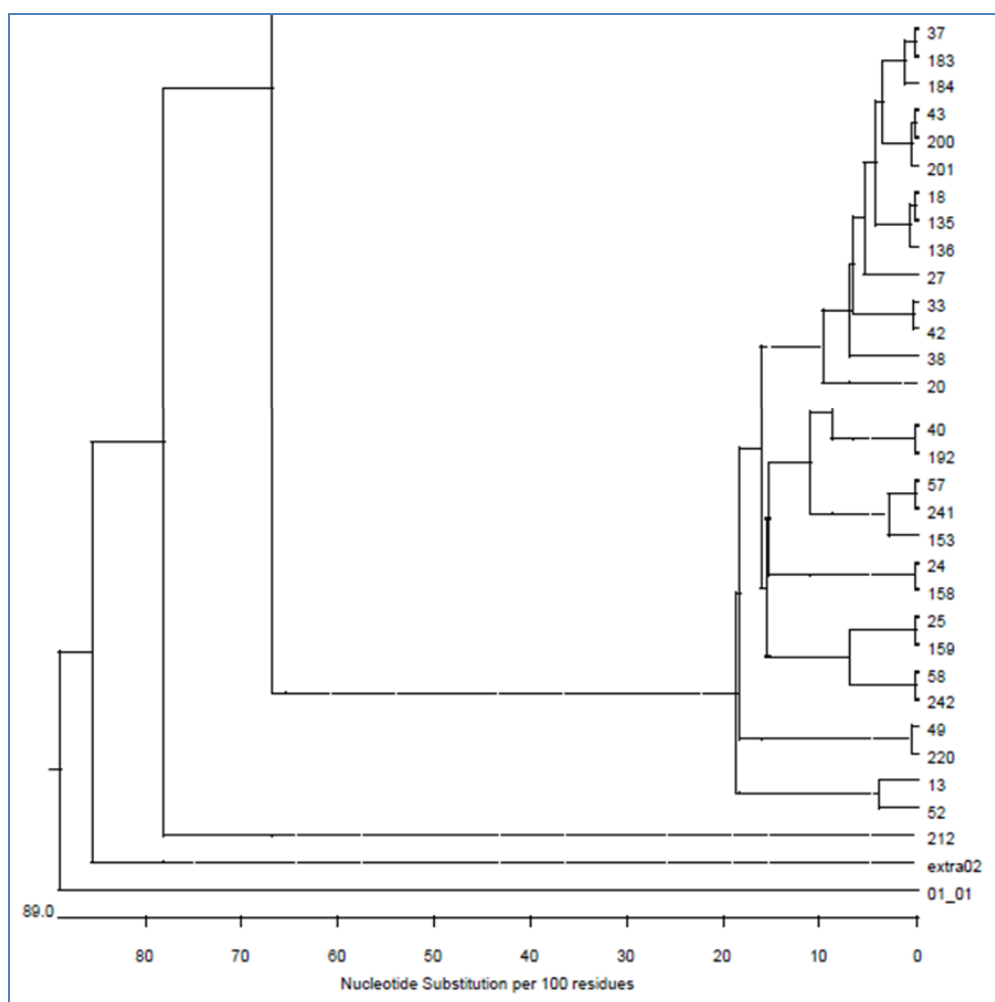


Figura 31. Exemplo de uma árvore filogenética obtida após alinhamento de parte das sequencias selecionadas.

3. RESULTADOS

3.1 GENES VH SELECIONADOS NA LINHAGEM GERMINATIVA CANINA

Inicialmente foram identificados 295 genes, contendo as sequências TATTACTGT ou CACAGTG. Quando cada gene foi analisado individualmente, observou-se que muitos estavam incompletos, pois não continham todas as CDR e *frameworks*, e por isso foram removidos.

No final, foram selecionados 92 genes VH, todos eles contendo os segmentos gênicos CDR e *framework*, assim como ambas as sequências, TATTACTGT e CACAGTG. A sequência gênica majoritária usada como referência para os 92 genes VH selecionados foi:

(FW1)GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAGCCTGGGGGG
 TCCCTGAGACTCTCCTGTGTGGCCTCT**(CDR1)**GGATTCACCTTCAGTAGCTACT
 ACA**(FW2)**TGAGCGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTGCG
 AGAT**(CDR2)**ATTAGCAGTGATGGAAGTAGCACAACTACGCAGACGCTGTGAAG
 GGCCGATTCACC**(FW3)**ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGC
 AGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTG**(CDR3)****TATTACTGTG**CG
 AGGGA**(RSS)****CACAGTG**

Na Figura 32, estão listadas as sequências dos 92 genes VH selecionados que compõem a biblioteca de genes construída nesse estudo.

Quando analisadas as similaridades entre os genes para definições das famílias foi possível identificar cinco famílias de genes VH: família VH1 com 34 genes, família VH2 com 22 genes, família VH3 com 19 genes, família VH4 com 12 genes e família VH5 com 5 genes. Na Figura 33 é possível observar a árvore filogenética com as famílias definidas.

Majority	90	100	110	120	130	140	150	160
	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
01_01	-----CTGAGAGGCCAAGGCAGCAGACCCAGCCACTCTGTCCTGTGGCCGGACCTGA							
04	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
05	-----GGTGAGTGAGATAAATGGGATTTGGGACAGTTCTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
07	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTAGGATCTTTCTTACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
10	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
11	-----GGCAAATGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTTTGCAGGCGT							
12	-----GGTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTTTGCAGGAGT							
13	-----GTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
15	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--ATCTGCAGGTTG							
16	-----GAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
17	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--ATCTGCAGGTTG							
18	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
19	-----GCTGAGTGAGAGAAATAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
20	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
21	-----ATGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
22	-----GCGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTATTCTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
23	-----TGAGTGAGAGAAATAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
24	-----AGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
25	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
26	-----GAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTT							
27	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
28	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
29	-----TTGCTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
31	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--ATCTGCAGGTTG							
32	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
33	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
34	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTTTGCAGGTTG							
35	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
37	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
38	-----GAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
40	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
41	-----ATGAAAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
42	-----AGTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
43	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
44	-----GTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
47	-----TTTGTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
48	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
49	-----AGGTGAATGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
50	-----TGAATGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
51	-----ATAAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
52	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
53	-----GTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
54	CATTGAGTGAGGTTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
55	-----GTGAATGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
56	-----TGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
57	-----AGGTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
83	-----GGATGGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
98	-----AGGGGATGTAGGATCTGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
101	-----GGATGTGGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTTTGCAGGCGT							
78	-----GCCTTCTGTGGGACAGACT--C--ACAATGACCCTCCT--GTCCCTAGGTTG							
117	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--ATCTGCAGGTTG							
123	-----GGGTGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
134	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--ATCTGCAGGTTG							
135	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
136	GTCGTGAGTG--GTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
147	-----CAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
154	-----GGATGTGGGACAGTATTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
155	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
158	-----GTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
159	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
160	-----GGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTT							
166	-----GAGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
169	-----GGACGTGGGACAGTCTTGACCAGGATGTCCTTG--ATCTGCAGGTTG							
177	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTTTGCAGGTTG							
178	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
183	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
184	GTAGGTGAGTGAAGGTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
192	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
200	-----AGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
201	GTCGTGAGTGAAGGTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
217	AAGAGACCTTGAGTTTGTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
219	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
220	-----AGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
223	-----AGATGTGGGATAATTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
225	-----GGGTGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
226	-----TGAGATAAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
231	-----GCATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
232	GTGTGTGAGTGAAGGTGAGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
235	CATTGAGTCTGAGTTGAGGTGAGAGAAACAGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
237	-----GGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
241	-----AGGGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
242	-----CAGTGGATGTGGGACAGTTTCTTGATGAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
99	-----TGATGGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
115	-----TGTGGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
121	-----CAGGTCAATCCGAGATAACTTAT--CCCTCTGTC--CT--CTCCACAGGTTG							
149	-----GGGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
153	-----GGATGCGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
212	-----GGGATTTGCGACTGTATCCAGCCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
extra01	-----GTGAGAGAAACATGATGTGGGACAGTTTCTTGACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
extra02	-----AACAGGGGATGTGGG--TAAGTGCCTCACCAGGATGTCCTTG--GTCGTCAGGTTG							
extra03	-----TGCTGAGGAGAGGATTAGGGCCAGTCAGGATGACTTAAT--ACCTCTGTC--CT--CTCCACAGGTTG							

Figura 32. Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes VH obtidos na linhagem germinativa canina. Noventa e dois genes VH selecionados, parte da biblioteca de genes de imunoglobulinas canina.

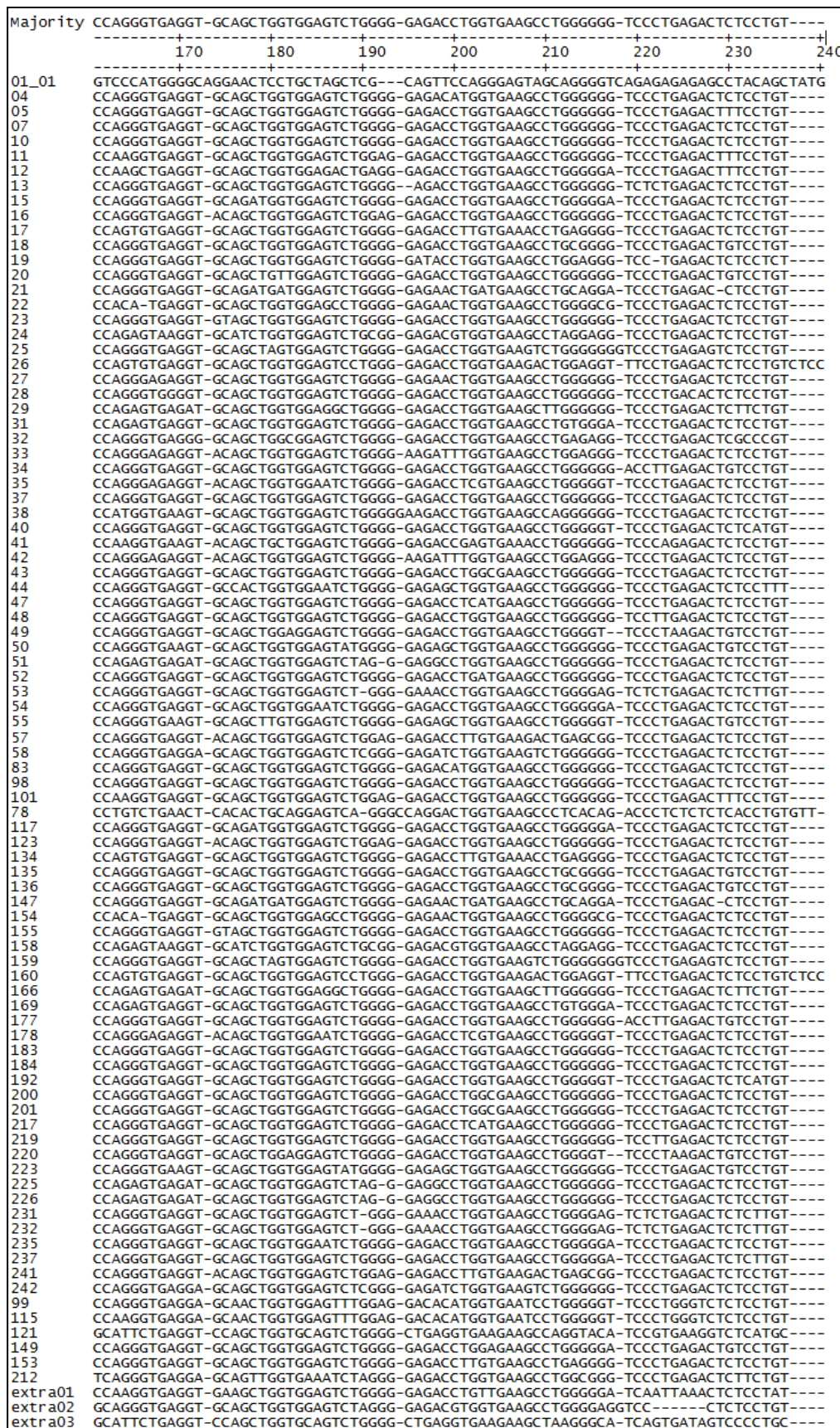


Figura 32. Continuação. Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes VH obtidos na linhagem germinativa canina. Noventa e dois genes VH selecionados, parte da biblioteca de genes de imunoglobulinas canina.


```

Majority ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
          +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          250     260     270     280     290     300     310     320
01_01  GGTAATGGCCAGAGAACCCTTAGGCCCTGGATCTCTGCCTGTCCCTGG----AGCTAGTGCCAGGTGGGAGCCCTACTTTGG
04     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGTAATTTGGGCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGG
05     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACCACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGG
07     ----GTAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTCCGACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGG
10     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAAGTACGAAATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGG
11     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
12     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACGACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTTACAGTGGG
13     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
15     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAAGTACAAAATGTACTGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG
16     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGTTTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGG
17     ----GTGGTCTCTGGCTTACCTTCAGTAGTACGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
18     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
19     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGACATGATGGGTCTGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
20     ----GTGGTCTCTGGATTACCTTCAGTAAGTATGGCATGAGCTGGGTCTGCCAGGCTTCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
21     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGTACTGGATCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
22     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACAAATGGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
23     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
24     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACAGCATGTTGGTGGGCCCTGAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
25     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGTACTGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
26     TGT-GTGGCTTCCGGATTACCTTCAGTAAGTACAGCATGATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
27     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
28     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACAGCATGCAATGGGTCTGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
29     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
31     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTATGACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
32     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
33     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
34     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTATGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
35     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
37     ----GTAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAAGTACGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
38     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
40     ----GTGACTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGTGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
41     ----GTGGCCTCAAGGTTACCTTCAGTAGTACAGCATGCAATGTCCTCCAGTCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
42     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACGAAATGAGCTGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
43     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
44     ----GTAGCCTCTGCATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
47     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
48     ----GTGGCCTCTGGTTTACCTTCAGTAGTACGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
49     ----GTGACCTCCGGATTACCTTCAGTAGTATGCCATGACATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
50     ----GTGGCCTCCGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGACATGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
51     ----GTGGACCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGTACTGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
52     ----GTGGCCTCCGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
53     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGCAATGGGTCTGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGGTGGG
54     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTATATGGAATGGGTCTGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGGTGGG
55     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGACATGGGTCTGC--AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
56     ----GTGGCCTCCGGATTACCTTCAGTAGTACGCAAGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
57     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTCTTACATGAGGTG--TCTGCCAGACTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
58     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGACATGAGCTGGGTCCACTAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
83     ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGTAATTTGGGCCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGG
98     ----GTAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTCCGACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGG
101    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
78     ----GTGTCCGGAGGCTCCGTCACCAGCAGTACTACTGGAATGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGA
117    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACAAAATGTACTGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
123    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGTTTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
134    ----GTGTCTCTGGCTTACCTTCAGTAGTACTACAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
135    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
136    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
147    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGTACTGGATCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
154    ----GTGGTCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGAGCTGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
155    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
158    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACAGCATGTTGGTGGGCCGTGAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
159    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGTACTGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
160    TGT-GTGGCTTCCGGATTACCTTCAGTAGTACTACAGCATGATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
166    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
169    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
177    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
178    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
183    ----GTAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAAGTACGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
184    ----GTAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAAGTACGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
190    ----GTGACTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGTGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
202    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
201    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
217    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTACAGCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
219    ----GTGGCCTCTGGTTTACCTTCAGTAGTACTGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
220    ----GTGACCTCCGGATTACCTTCAGTAGTACTGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
223    ----GTGGCCTCCGGATTACCTTCAGTAGTACTACATGACATGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGT
225    ----GTGGACCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGTACTGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
226    ----GTGGACCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGTACTGGGTCCACCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
231    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGCAATGGGTCTGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTTGGGTGGG
232    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGCAATGGGTCTGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTTGGGTGGG
235    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTATATGGAATGGGTCTGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAGTGGG
237    ----GTGGCCTCCGGATTACCTTCAGTAGTACTGCAAGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAGTGGG
241    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTTACATGAGGTG--TCTGCCAGACTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
242    ----GTGGCCCCCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGACATGAGCTGGGTCCACTAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
99     ----CAGGCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
115    ----CAGGCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
121    ----AAGACATCTGGATACACCTTACAGTACTATATGTAATGGGTCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
149    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
153    ----GTGGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTACTTACATGAGCTGGTTCTGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
212    ----GAGTCTCTACATTCACCTTTTACAGCAAGCATACATTTGGCTCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
extra01 ----GTGACCTCTGGATTACCTTCAGGAGCTACTGGATGAGCTGGGTCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
extra02 ----GTGGCCTCTAGATTACCTTCAGTAGTACTTACATGGGCTGGGTCCACTAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG
extra03 ----AAGACATCTGGATACAGCTTACAGTACTATTTGGAATGGGTATGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGG

```

Figura 32. Continuação. Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes VH obtidos na linhagem germinativa canina. Noventa e dois genes VH selecionados, parte da biblioteca de genes de imunoglobulinas canina.

Majority	TCGCAGATATTAGCAGTGAT	GGAAAGTACACAACTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
	330	340	350	360	370	380	390	400
01_01	CCTCAGATGGCCATGCCGGGAGGAGAAACAGAGCCCCGTGCCCCCTGGGAGAGAATGTGCAGGGATCATGCAATGAAA							
04	TCTCACACATTAACAAGAT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
05	TCGCATACATTAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
07	TCGCATACATTAGCAATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
10	TCGCAAGGATTTATGAGAGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGAAAGCTGTAAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
11	TCTCAGAAATTAGCAGTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
12	TCACATACATTAGCAATGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
13	TCGGATACATTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
15	TCGCAAGGATTTATGAGAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGAAAGCTGTAAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
16	TCGCATACATTAACAAGAT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
17	TCGCATACATTAGCAGTGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
18	TCGCAGGATTTAAACAGCGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
19	TCGCATACAGTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
20	TCGCAGCTATTAGCTAAGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
21	TCGCAGTATTAGCACAGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
22	TCGCAGGTTTTAAACAGCGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
23	TTGCAGAAATTAGCGGTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
24	TCGCAGGATTTAGATATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
25	TCGCATAGATTAGGTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGAAAGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
26	TCACAACATTAGCAATAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACAGTAAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
27	TCGCAGATATTAGTACAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
28	TCGCATACATTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
29	TTGCATACATTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
31	TCGCATACATTAGCAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
32	TCGCATGAATTTATCTAGT	GGAAAGTAACTAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
33	TCTCATGGATTAGGTATGAT	GGAAAGTATCTCAAGGTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
34	TCGCAGTTATTTGGAATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
35	TCGCAGATATTAGTGATAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
37	TCGCAGCTATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
38	TTGCAGCTATTAGCAGTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
40	TCGCATACATTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
41	TCACATACATTAGCAGTAAT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
42	TCTCATGGATTAGGTATGAT	GGAAAGTACCTCAAGGTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
43	TCACAGCTATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
44	TCTCAGTAATTAACAAGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
47	TCGCATGGATTTAAGCTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
48	TCACACGGATTAGCAATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
49	TCGCAGTTATTAGCAGGGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
50	TCGCATGAATTAGGAGTGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
51	TTGCAGAAATTAGCAGTACT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
52	TCGCATACATTAGCAGTGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
53	TTGCAATTTATTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACAGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
54	TCGCAGGATTAGCAGTGAC	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
55	TTGCAAGAAATTAGGAGTGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
56	TAGCAGTTATTAGCAGTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
57	TTGCAGAAATTAGCAGTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
58	TTGCATACATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
83	TCTCATAATTAACAAGAT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
98	TCGCATACATTAGCAATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
101	TCTCAGAAATTAGCAGTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
78	TGG--GGTACTGG-----	ACAGGTAGCACAAGCTACAAAGCTGGCATTCCAGGGACGATCCCATC	ACTGCTGAC					
117	TCGCAAGGATTTATGAGAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGAAAGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
123	TCGCATACATTAGCAGTGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
134	TCGCATACATTAGCAGTGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
135	TCGCAGGATTTAAACAGCGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
136	TCGCAGGATTTAAACAGCGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
147	TCGCAGGATTTAGCACAGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
154	TCGCAGGTTTTAAACAGCGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
155	TTGCAGAAATTAGCAGTACT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
158	TCGCAGGATTTAGATATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
159	TCGCATGGATTAGGTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGAAAGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
160	TCACAACATTAGCAATAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACAGTAAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
166	TTGCATACATTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
169	TCGCATACATTAGCAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
177	TCGCAGTTATTGGAATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
178	TCGCAGATATTAGTGATAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
183	TCGCAGCTATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
184	TCGCAGCTATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
192	TCGCATACATTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
200	TCACAGCTATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
201	TCACAGCTATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
217	TCGCATGGATTTAAGCTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
219	TCACACGGATTAGCAATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
220	TCGCAGTTATTAGCAGGGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
223	TCGCATGAATTAGGAGTGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
225	TTGCAGAAATTAGCAGTACT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
226	TTGCAGAAATTAGCAGTACT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
231	TTGCAATTTATTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACAGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
232	TTGCAATTTATTAAACAGTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACAGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
235	TCGCAGGATTTAGCAGTGAC	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
237	TAGCAGTTATTAGCAGTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
241	TTGCAGAAATTAGCAGTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
242	TTGCATACATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
99	TCGCAGATATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
115	TCGCAGATATTAGCTATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
121	TGGCAGAGATTTGGTCCCTAA	GATGGTGGCCAAAGGTATGCAGAAAGTTTCAGGGAGAGTCCACCTG	TAAACAGACA					
149	TCTCATTTGATTAGGTATGAT	GGAAAGTACACAAAGGTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
153	TTGCAGAAATTAGCAGTAGT	GGAAAGTACACAAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
212	TCATATCCAATAGCAGTAAT	GGAAAGTACATGACTATGCAGACGCTGTAAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
extra01	TCATATGGGTTAATACTGGT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGATGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
extra02	TCGCAGGATTTAGCAATGAT	GGAAAGTACACAAAGCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATC	TCCAGAGACA					
extra03	TGGGATGGATTGGTCTGAA	GATGGTGGACAAAGTATGTGCAGAAAGTTCCAGG	CAGAGTCCCTG	ATGGCAGACA				

Figura 32. Continuação. Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes VH obtidos na linhagem germinativa canina. Noventa e dois genes VH selecionados, parte da biblioteca de genes de imunoglobulinas canina.

Majority	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
	410	420	430	440	450	460	470	480
01_01	GCCACTTGTAGCTTGGCTAGC	TTGTTTTAATCTCTTTACATTTCTGGAGCTCATTAAATTTCTATTACTGTTTCTTTTCT						
04	---ACGCCAAGAATACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
05	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
07	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
10	---ACGCCAAGAACATG---	---GCGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
11	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
12	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
13	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
15	---ACGCCAAGAACATG---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
16	---ACGCCAAGAACACA---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGACAGTGGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
17	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
18	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
19	---ATGCCAAGAACACA---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGT-GAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
20	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
21	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACATGGCCATGTATTACT					
22	---ATGTCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGATCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
23	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
24	---ATGCCAAAAACACA---	---CTGTATCTGTAGAAGAACAGCCTGAGAGCCGAG-GGAGGACACGGCCGTGTATTACT						
25	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
26	---ACACCAAGAACACG---	---CTGTATCTACAGATGAGCAGCCTGGGAGCCGAT-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
27	---ACGTCAAGAACACG---	---CTGTATTTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
28	---ACGTCAAGAACACG---	---CTATATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
29	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
31	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
32	---ATGCCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACATGGCCATGTATTACT					
33	---ATGTCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCATATATTACT					
34	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
35	---ACGCCAAGAACAAG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
37	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
38	---ACGCCAAGAACATG---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ATATTGCTGTGTATTACT					
40	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
41	---AAGCCAAGAACATG---	---CTTTATCTACAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACATAGCCCTGTATTACT					
42	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCATATATTACT					
43	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
44	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
47	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTTTCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACAAGGCCATGTATTACT					
48	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
49	---ACGCCAAGAACATG---	---CTGTATCTACAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCATGTATTACT					
50	---ATTCCAAGAACAAT---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCCTATATTACT					
51	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTACCTGCAGGTGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
52	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
53	---ATGCCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACATGACCCGCTATTACT					
54	---ATGCCAAGA---	---	---CGGCCGTGTATTACT					
56	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
57	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---TCACAGCCGTATATTACT					
58	---ACGCCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
83	---ACGCCAAGAATACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
98	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
101	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
78	---CGGCCAAGAACCAG---	---TTCTCCCTGCAGCTGAGCTCCATGACACCAGG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
117	---ACGCCAAGAACATG---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
123	---ACGCCAAGAACACA---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGACAGTGGAG-G---	---ACACAGCCCTTTATTACT					
134	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCGTGTATTACT					
135	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCATGTATTACT					
136	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCATGTATTACT					
147	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACATGGCCATGTATTACT					
154	---ATGTCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
155	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCATGTATTACT					
158	---ATGCCAAAAACACA---	---CTGTATCTGTAGAAGAACAGCCTGAGAGCCGAG-GGAGGACACGGCCGTGTATTACT						
159	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
160	---ACACCAAGAACACG---	---CTGTATCTACAGATGAGCAGCCTGGGAGCCGAT-G---	---ACACGGCCCTGTATTACT					
166	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCATATATTACT					
169	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCATGTATTACT					
177	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
178	---ACGCCAAGAACAAG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCGTGTATTACT					
183	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
184	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
192	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
200	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCTGTGTATTACT					
201	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCTGTGTATTACT					
217	---ACGCCAAGAACACA---	---GTGTTTCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACAAGGCCATGTATTACT					
219	---ACGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCGTGTATTACT					
220	---ACGCCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCATGTATTACT					
223	---ATTCCAAGAACAAT---	---CTGTATCTGCAGATGACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCCTATATTACT					
225	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTACCTGCAGGTGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
226	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTACCTGCAGGTGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
231	---ATGCCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACATGACCCGCTATTACT					
232	---ATGCCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACATGACCCGCTATTACT					
235	---ATGCCAAGA---	---	---CGGCCGTGTATTACT					
237	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCGTGTATTACT					
241	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---TCACAGCCGTATATTACT					
242	---ACGCCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
99	---ACACCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCGTGTATTACT					
115	---ACACCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCGTGTATTACT					
121	---CATCCACAAGCAC---	---GCCACATGGAGCTGAGCAGCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCATGTACTACT					
149	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCGTGTATTACT					
153	---ATGCCAAGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACATGGCCGTATATTACT					
212	---GCACCAAGGAACATG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCGTGCATTGCT					
extra01	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCATATGAACAGCCTG---	---ATAGCCCTGTATTACT					
extra02	---ATGCCAAGAACACG---	---CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGGGAGCCGAG-G---	---ACACGGCCGTGTATTACT					
extra03	---CAACCACAAGCAC---	---GCCAACATGGAGCTGACAGCTGAGAGCCGAG-G---	---ACACAGCCATGTACTACT					

Figura 32. Continuação. Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes VH obtidos na linhagem germinativa canina. Noventa e dois genes VH selecionados, parte da biblioteca de genes de imunoglobulinas canina.

Majority	GTGCGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
	490	500	510	520	530	540	550	560
01_01	TTTCTTAAAGACAATAAAATCTTTAAAAATCCAGAAATCACTGGAGAAAATCTTCCTA	-----	TGTTTCATGGGCAG					
04	GTGCAAA--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTGAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
05	GTGCGAG--TGACAC	---CGTGAGGGGAACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
07	GTGC	---AGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAAACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT				
10	GTGCGAG--TGACAC	---AATGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
11	GTGCAAG--GGACAC	---AGTGAGGTGACCTCTGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
12	GTGTGAG--TGACAC	---CGTGAAGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
13	GTGGGAAGGGACAC	---AATGGGGGAACTTCACTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGCAGAAGGGGAT					
15	GTGTGAG--TGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
16	GTGCGAG--AGACAC	---AGTGAGGCACCTCAGTGTGAGCTCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
17	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--ACTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
18	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCAAACTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
19	GTGCAAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGTCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
20	GTGAGAG--TGACAC	---AATGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
21	GTGC	---AGACAC	---AGTGAGGGGACGCAAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT				
22	GTGTGAA--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
23	GTGCA--GGACAC	---AGTGAGGCACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	TGCAGAAGCTGTCAGAAGGGGAT					
24	GTGCGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----GGTCAAGGGGAT					
25	GTGCGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
26	GTGTGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGATAT					
27	GTGCGAA--GGACAC	---AATGAGGTGAACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
28	GTGCGGG--TGATAC	---AGTGAGTGCACCTAAGTGTGAGCCAAACACAAAATCTACC	-----TGTATAAGGGGAT					
29	GTGT	---GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGTCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT				
31	GTGCGGG--TGACAC	---AGTGAGGGAACATCAGTGTGAGCCAGACACAAAACCTCCC	-----TGGAGAAGTGGAT					
32	GTGTGAA--TGATAC	---AGTTAGGGGACCTCAGAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
33	GTGCA--GACAC	---AGTCAAGGGGAAATCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGGTGGGGAT					
34	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGTGCACCTCAGTGTGAGTCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
35	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGTGAACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTT--AAGGGGAT					
37	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCAAACTCAATGTGAACTCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTTGAAAGGGAT					
38	GTGGGAA--GGACAC	---AGAGAGTGCACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
40	GTGCGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
41	GTGCA--GATGC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACAGAAA--CCTCCC	-----TGCA---GGGAC					
42	GTGCA--GACAC	---AGTCAAGGGGAAATCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGGTGGGGAT					
43	GTGT	---GGACAC	---AGTGAGGTGAACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAATGGGTT				
44	GTGC	---ACACAC	---CGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGTCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT				
47	GTGCGAG--GGACAC	---AGAGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
48	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
49	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGTGCACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
50	GTGCGAT--GGACAC	---AGTGACAGGATCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
51	GTGTGAG--TGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
52	GTGTGAAGGGGACAC	---AATGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
53	GTGTGAG--TGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCATACACAAA--GCTCCC	-----TATAGAAGGGGAT					
54	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGTGACCTAAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
55	GTGCAAG--GGACAG	---AGTGATGGGACCTCAGTGTGAAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
56	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGTCAACCTCAGTGTGAGCCAGACAGAAA--CCTCCC	-----TGTT--AAGGGGAT					
83	GTGCAAA--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTGAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
98	GTGC	---AGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAAACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT				
101	GTGCAAG--GGACAC	---AGTGAGGTGACCTCTGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
78	GTGCAAG--AGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----GCAGGGGACACAGGA					
117	GTGTGAG--TGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
123	GTGCGAG--GGACAC	---AGTGAGGCACCTCAGTGTGAGTCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
134	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--ACTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
135	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCAAACTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
136	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCAAACTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
147	GTGC	---AGACAC	---AGTGAGGGGACGCAAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT				
154	GTGTGAA--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
155	GTGCGAA--GGGACAC	---AGTGAGGCACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	TGCAGAAGCTGTCAGAAGGGGAT					
158	GTGCGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAACCCAGACACAAA--CCTCCC	-----GGTCAAGGGGAT					
159	GTGTGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
160	GTGTGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGAT					
166	GTGT	---GGGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGTCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT				
169	GTGCGGG--TGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAAACCTCCC	-----TGGAGAAGTGGAT					
177	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGTCAACCTCAGTGTGAGTCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
178	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGTCAACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTT--AAGGGGAT					
183	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCAAACTCAATGTGAACTCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTTGAAAGGGAT					
184	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCAAACTCAATGTGAACTCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTTGAAAGGGAT					
192	GTGCGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
200	GTGT	---GGACAC	---AGTGAGGTGAACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAATGGGTT				
201	GTGT	---GGACAC	---AGTGAGGTGAACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAATGGGTT				
217	GTGCGAG--GGACAC	---AGAGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
219	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGCACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
220	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGTCAACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
223	GTGCGAT--GGACAC	---AGTGACAGGATCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
225	GTGTGAG--TGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
226	GTGTGAG--TGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
231	GTGTGAG--TGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCATACACAAA--GCTCCC	-----TATAGAAGGGGAT					
232	GTGTGAG--TGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCATACACAAA--GCTCCC	-----TATAGAAGGGGAT					
235	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGGTGACCTAAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
237	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGTCAACCTCAGTGTGAGCCAGACAGAAA--CCTCCC	-----TGTT--AAGGGGAT					
241	GTGCAAG--GTACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TATAGAAGGGGAT					
242	GTGCA--GACAC	---AGTGAAGGGGACCTCTGTGTGAGCCAGACACAAA--CATCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
99	GCATGAG--GAACAC	---AGTGAGTTGACATCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
115	GCATGAG--GAACAC	---AGTGAGTTGACATCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
121	CTGTGA--GACAC	---AGTGTGAGAACCCACATCTGGGAGTGTGAGAACCCCTGGTG	---AGAGCCGACGCTGTGATA					
149	GTGCGAA--GGACAC	---AGTGAGTCAACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
153	GTGCGAA--GTACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGTCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
212	GTGCGAG--GGACAC	---AGTGAGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
extra01	GTGTGAG--TGACAC	---ATTGCGGGGACCTTGTGTGAGTCCAGACAGAAAATCTCCT	-----GGTGAAGGGGAT					
extra02	GTGTGAA--ACAGAG	---AGTGTGGGGACCTCAGTGTGAGCCAGACACAAA--CCTCCC	-----TGTAGAAGGGGAT					
extra03	GTGTGA--GAC	---AGTGTGAGAACCCACATCTGGGAGTGTGAGAACCCCTGGTG	---AGATGACAGCTGTGCTG					

Figura 32. Continuação. Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes VH obtidos na linhagem germinativa canina. Noventa e dois genes VH selecionados, parte da biblioteca de genes de imunoglobulinas canina

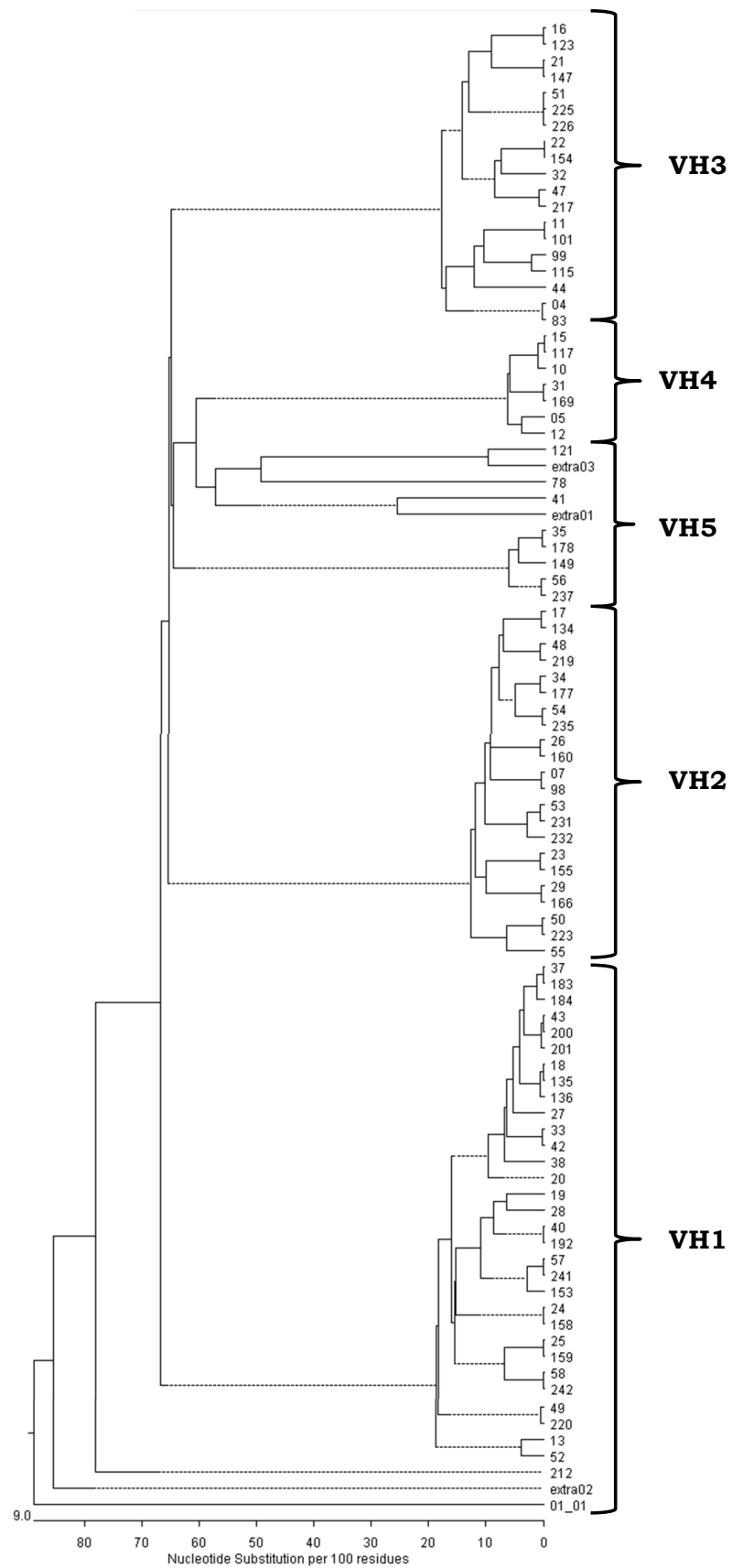


Figura 33. Árvore filogenética gerada através do programa Megalign. Estão identificadas as 05 famílias dos genes VH selecionados na linhagem germinativa canina.

3.2 GENES DH SELECIONADOS NA LINHAGEM GERMINATIVA CANINA

Foram identificados 10 genes DH situados entre as sequências de recombinação de sinal (RSS) (Figura 34 e 35).

```

Majority AGXTTXXGXAXAGGCTGTXTCACTGTGCTAXTGACGTAGTGAGGGC-CACAGTXAXXACXXCAXAXACAAAAXCCXXX
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          10      20      30      40      50      60      70      80
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
DH1      GGATTGGGGGTGGCTCTGTGTCACCTGTGTTACTACTGTACTGATGAT-TACTGTTTCAACCACAGCATTTCAGCGCCCAT
DH2      ACTTTTTGACAAGGAACATTGCACTGTGCTACTACGGTAGCTACTAC-CACAGTGACAGAGGCAGCAGCAAAAACC
DH3      AGTTATTGTCAAAGGGTGTACACAGTGT-AT--ATATATATGGATACCACAGTGATGCCCTCCATAGCAGCAACC
DH4      GGTTTCAGACCTGGTCTGTGTCACGGTGGTATAGTAGCAGCTGGTAC-CACAGTGACACCATCCAGGC-CAGAAAACC
DH5      AGATTTTGTAAAGGCTGAGGCAGTGTGA-GTTC TAGTAGTTGGGGCTCACAGTGCCCTCAGACCAATCACAAAACC
DH6      GGGTTTGGCCAGGTAGGAACCACAGTGCTA--ACTGGGGCCACAGT-GATTGACAGCTCTACAAAACC
DH7_nr   AGCTGGAGAGCTGGCCACTGCCACTGTGGTTGT-TCCTCC TGGGGCCTAACAAGATAAACAACCACCCTGAGCCTCACA
DH8_nr   -----CCTGTATTACTGTGCAGGGACACAGTGAGGGGACCTCAGTGTGAATCCAGACACAAACGTCCCT
DH9_nr   -----CATGTATTACTGTGCGGGTGACACAGTGAGGGAACATCAGTGTGAGCCCAGACACAAAACCTCC
DH10_nr  -----CGTGTATTACTGTGCGAAGGACACAGTGAGGCACCTCAGTGTGAGCCCAGACACAAAACCTCC
  
```

Figura 34 Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes DH obtidos na linhagem germinativa canina. 10 genes DH selecionados, parte da biblioteca de genes de imunoglobulinas canina.

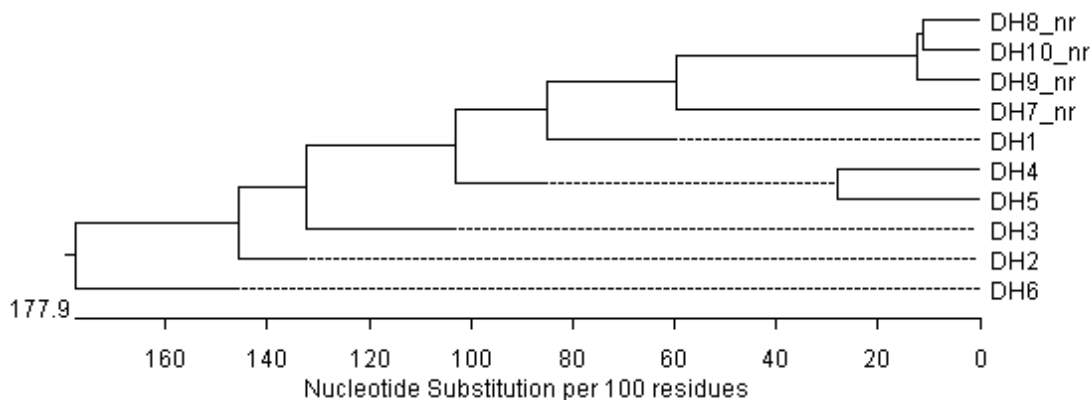


Figura 35, Árvore filogenética gerada através do programa Megalign mostrando as relações filogenéticas dos genes DH.

3.3 GENES JH SELECIONADOS NA LINHAGEM GERMINATIVA CANINA

Foram identificados 09 genes JH situados após as sequências conservadas de recombinação de sinal (RSS) (Figuras 36 e 37).

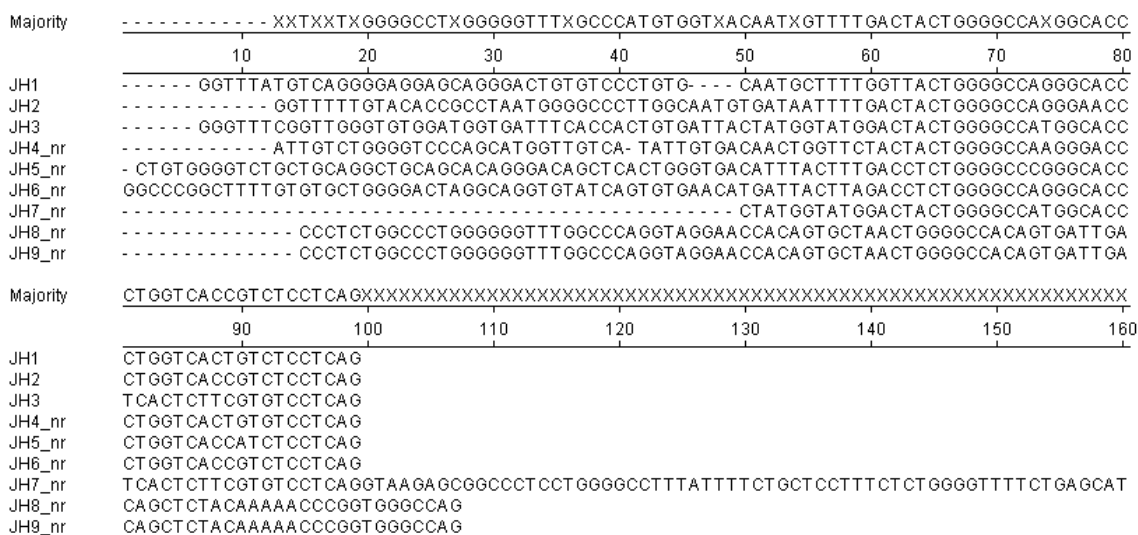


Figura 36. Sequências múltiplas alinhadas de todos os genes JH obtidos na linhagem germinativa canina. 09 genes JH selecionados, parte da biblioteca de genes de imunoglobulinas canina.

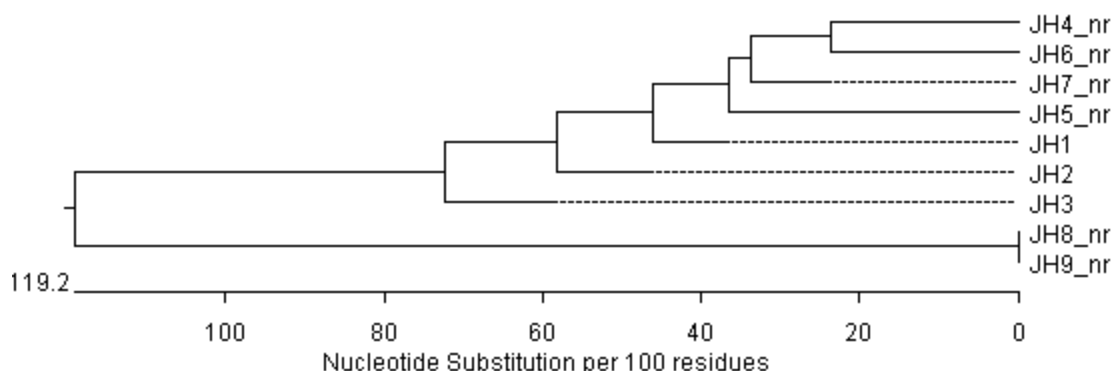


Figura 37. Árvore filogenética gerada através do programa Megalign mostrando as relações filogenéticas dos genes JH.

4. DISCUSSÃO

Neste capítulo identificamos o repertório de genes que compõem a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina canina. A partir desse repertório construiu-se uma biblioteca gênica com 92 genes VH, 10 genes DH e 09 genes JH. A análise da similaridade entre as sequências dos genes VH demonstrou que o *locus* da cadeia pesada da imunoglobulina analisado possui cinco famílias de genes: VH1 com 34 genes, família VH2 com 22 genes, família VH3 com 19 genes, família VH4 com 12 genes e família VH5 com cinco genes.

Bao e colaboradores (2010) também realizaram uma caracterização do repertório de genes VH em cães, porém eles localizaram apenas 80 genes VH, seis genes DH e três genes JH. Além disso, esses autores descreveram apenas três famílias VH, sendo que a família principal e maior (VH1) tem um total de 76 genes. A sequência de cDNA de gene VH canino (XM_844149) utilizada por eles na busca das sequências genômicas foi removido do Genbank, tornando difícil a comparação com a sequência utilizada no presente estudo e avaliar possíveis diferenças entre ambas que explicasse a discrepância no número de genes (BAO et al, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado que o número de genes e a extensão da diversidade entre os segmentos gênicos variam de acordo com a espécie (VAN DIJK et al, 1993; CHEVILLARD et al., 2002). Em seres humanos, a região variável é composta de sete famílias de gene VH na linhagem germinativa, incluindo 100 genes, além de 30 segmentos gênicos DH e seis segmentos gênicos JH (VAN DIJK et al, 1993).

No presente estudo, descrevemos os segmentos gênicos, VH, DH e JH de imunoglobulina na espécie *Canis lupus familiaris* assim como o grau de similaridade entre os genes VH, categorizando-os em famílias. Esses dados nos permitirão futuramente analisar resultados dos estudos

relacionados a diversidade e clonalidade de células imunocompetente como células B e plasmócitos dos baços de cães com leishmaniose visceral.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO GERAL

Desde que os resultados obtidos em cada etapa deste estudo foram discutidos nos capítulos nos quais foram apresentados, nesta discussão abordaremos algumas questões mais gerais e perspectivas associadas a este estudo.

No conjunto de estudos apresentados nos capítulos anteriores procuramos contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na desorganização do tecido esplênico associada à LV. Estudos do nosso grupo têm mostrado que há uma relação entre a desorganização linfóide esplênica e formas graves da LV (SANTANA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2013). Em estágios graves de LV, a emergência de coinfeções pode favorecer ao aprofundamento das alterações esplênicas e à progressão da LV. Sabe-se que o baço desempenha um papel importante na defesa contra a infecção viral e bacteriana sistêmica (ANDRADE *et al.*, 1990, BENEDICT *et al.*, 2006). A desorganização dos microambientes do baço pode interferir com a resposta imunológica a infecções bacterianas, tais como conjuntivite purulenta e com o estado inflamatório observada nestes animais (dado não publicado).

Os compartimentos do tecido linfóide do baço estão alterados nas diferentes fases da evolução da leishmaniose visceral e apresentam profunda desorganização associada à plasmocitose em formas graves da doença em cães e humanos (SANTANA *et al.* 2008; SILVA *et al.* 2012; VERESS *et al.* 1983; VERESS *et al.* 1977). Essa desorganização estrutural do baço parece não ser privativa da LV e pode contribuir para a manutenção e agravamento de enfermidades crônicas (BRANDT *et al.* 2005; HANSEN *ET AL.* 2001).

Na LV, as alterações esplênicas podem tornar-se mais evidentes devido ao fato de ser este órgão comprometido durante todo o curso da enfermidade (CARRION *et al.* 2006; WILSON *et al.* 1996).

No presente estudo, trabalhamos com cães errantes ou semi-domiciliados, e sabemos que nesses animais outras enfermidades também podem cooperar para a desorganização estrutural do baço. A cinomose, por exemplo, é uma doença viral endêmica no Brasil e também está associada com a desestruturação rompimento do tecido linfóide (KUMAGAI *et al*, 2004). A infecção pelo vírus da cinomose, por exemplo, pode causar atrofia e depleção de células em órgãos linfóides resultando em ruptura de tecido linfóide e imunodeficiência em cães (MCCULLOUGH B *et al*, 1974; STEVENS DR, *et al*, 1976).

Porém, apesar da provável contribuição de coinfeções para a desorganização estrutural do baço em cães com LV, sabemos com base em estudos com modelos experimentais murinos que a infecção por *Leishmania*, *per si*, pode resultar nessa alteração esplênica (ATO, *et al*, 2004, ATO *et al*, 2006, ENGWERDA *et al*, 2010).

Muito do papel desempenhado pelo baço na defesa contra infecções é dependente de interações celulares que ocorrem na zona marginal e nos folículos linfóides, que como demonstramos nos capítulos anteriores estão comprometidas nesses animais. Os seres humanos que morrem de leishmaniose visceral grave também apresentam desorganização estrutural do tecido linfóide além de infecções bacterianas no pulmão, ouvido, mucosa oral, trato intestinal e pele (ANDRADE *et al*, 1990; VERESS *et al*, 1977).

A desestruturação do tecido linfóide na leishmaniose visceral tem sido estudada na perspectiva da compreensão dos mecanismos de susceptibilidade de cães e seres humanos a formas graves da LV e do acompanhamento da evolução da enfermidade em cães. Está em curso, em nosso laboratório a validação de uma técnica de *cell-block* que tem se mostrado promissora para avaliação sequencial das alterações esplênicas em cães. A técnica de *cell-block* permite a análise dos compartimentos esplênicos em material proveniente de aspirado do

baço obtido *in vivo*, sem necessidade de sacrifício dos cães (SANTOS, ORNELAS *et al*, 2008, Figura 38).

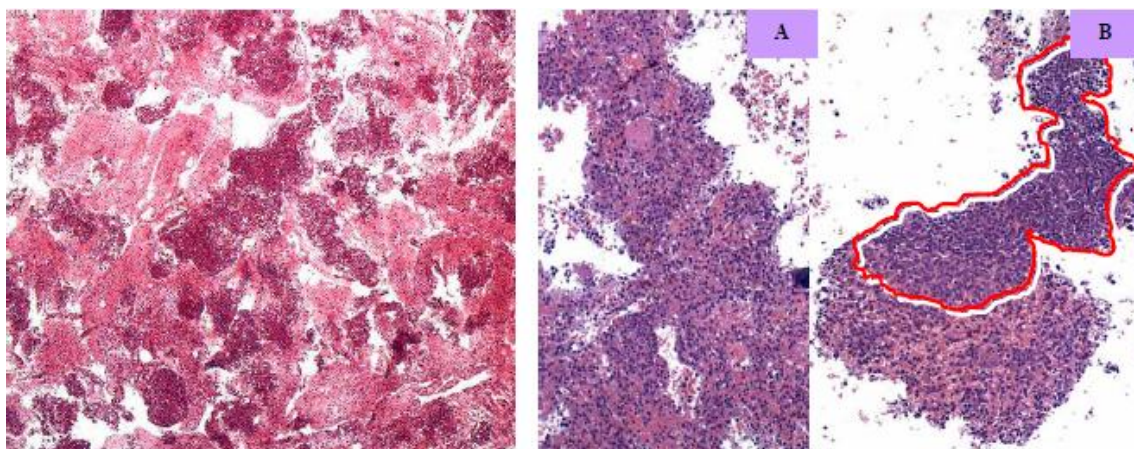


Figura 38. Histologia do aspirado esplênico processado através da técnica de cell-block e corado com HE. A = polpa vermelha, B = destaque da polpa branca.

Esta técnica de *cell-block* pode compor um painel de testes que serão relevantes na identificação com maior acurácia de cães susceptíveis ao desenvolvimento de formas graves de LV e para o estudo da resposta de cães a vacinas e terapêuticas contra a leishmaniose visceral canina. A proposta é compor um painel de testes que permitirá uma decisão segura sobre o acompanhamento e manutenção de uma população de cães resistentes ao desenvolvimento de doença, nas áreas endêmicas, com potencial efeito protetor contra infecções humanas. Esse aspecto é particularmente importante tendo em vista que atualmente, cães susceptíveis e resistentes à leishmaniose visceral são removidos indiscriminadamente das áreas endêmicas. Essa prática não tem tido o desejado efeito de redução da transmissão, possivelmente, por uma variedade de fatores, entre eles, a potencial retirada de cães resistentes à disseminação do parasito e substituição por novos cães susceptíveis, adquiridos pelos donos, que têm seus animais eutanasiados (DOS-SANTOS *et al*, 2013).

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

1. A redistribuição de populações celulares do baço, em especial de células B, células dendríticas foliculares e plasmócitos está relacionada com a desorganização do tecido esplênico e com a atrofia da polpa branca em cães de uma área endêmica para leishmaniose;
 2. A desorganização do tecido linfóide esplênico de cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral atinge predominantemente a formação de folículos
 3. Há relação entre a desorganização do tecido esplênico de cães de área endêmica para leishmaniose visceral e a diminuição da expressão de CXCL13, quimiocina que controla a organização dos folículos de células B;
 4. A desorganização do tecido linfóide esplênico em cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral está associada com disglobulinemia, hipergamaglobulinemia, ativação policlonal e plasmocitose intensa no baço, especialmente de plasmócitos secretores de IgG;
 5. Há relação entre a plasmocitose observada em cães com LV e o aumento da expressão das citocinas CXCL12, BAFF e APRIL, que são envolvidas na ativação e *homing* de plasmócitos.
-

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS

AICHELE, P.; ZINKE, J.; GRODE, L. et al. Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses **J. Immunol.** v.171 p.1148-1155, 2003.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; GUTIERREZ-SOLAR, B. et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years **Clin. Microbiol. Rev.** v.10 p.298-319, 1997.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence **PLoS One** v.7 p.35671, 2012.

ANDRADE, C. R.; NASCIMENTO, A. E.; MOURA, P. M. et al. Leishmania donovani donovani and Leishmania donovani chagasi as antigens in a direct agglutination assay for the diagnosis of kala-azar **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.22 p.611-615, 1989.

ANDRADE, T. M.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis **J. Infect. Dis.** v.162 p.1354-1359, 1990.

ANSEL, K. M.; NGO, V. N.; HYMAN, P. L. et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles **Nature** v.406 p.309-314, 2000.

ARAUJO E SILVA, E.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. [Behavior of Lutzomyia longipalpis, the main vector of American visceral leishmaniasis, in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul] **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.40 p.420-425, 2007.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.59 p.53-57, 1998.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control **Clin. Dermatol.** v.14 p.523-532, 1996.

ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses **Int. J. Parasitol.** v.30 p.1269-1281, 2000.

ATO, M.; MAROOF, A.; ZUBAIRI, S. et al. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to Leishmania donovani infection in mice deficient in CCL19 and CCL21 **J. Immunol.** v.176 p.5486-5493, 2006.

ATO, M.; NAKANO, H.; KAKIUCHI, T. et al. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19 **J. Immunol.** v.173 p.4815-4820, 2004.

ATO, M.; STAGER, S.; ENGWERDA, C. R. et al. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis **Nat. Immunol.** v.3 p.1185-1191, 2002.

ATTANAVANICH, K.; KEARNEY, J. F. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells **J. Immunol.** v.172 p.803-811, 2004.

BADARO, R.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H. et al. Leishmania donovani: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients **Lancet** v.1 p.647-649, 1986.

BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil **J. Infect. Dis.** v.154 p.639-649, 1986.

BALEEIRO, C. O.; PARANHOS-SILVA, M.; DOS SANTOS, J. C. et al. Montenegro's skin reactions and antibodies against different Leishmania species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area **Vet. Parasitol.** v.139 p.21-28, 2006.

BALOGH, P.; HORVATH, G.; SZAKAL, A. K. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen **J. Histochem. Cytochem.** v.52 p.1287-1298, 2004.

BAO, Y.; GUO, Y.; XIAO, S. et al. Molecular characterization of the VH repertoire in Canis familiaris **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.137 p.64-75, 2010.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis **Parasite Immunol.** v.28 p.329-337, 2006.

BARRAL, A.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M. et al. Isolation of Leishmania mexicana amazonensis from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.35 p.732-734, 1986.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; SANTOS, S. O. et al. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniasis **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.111 p.251-261, 2006.

BENEDICT, C. A.; DE TREZ, C.; SCHNEIDER, K. et al. Specific remodeling of splenic architecture by cytomegalovirus **PLoS Pathog.** v.2 e16, 2006.

BENNER, R.; HIJMANS, W.; HAAIJMAN, J. J. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation **Clin Exp Immunol** 46 1-8 1981

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M. et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.55 p.273-277, 1996.

BETTINI, S.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. et al. Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.80 p.458-459, 1986.

BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: W. DOERR, E.; SEIFERT, G. (Ed.). **Tropical Pathology** v.8 p.597-651, 1995.

BLEUL, C. C.; FARZAN, M.; CHOE, H. et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry **Nature** v.382 p.829-833, 1996.

BRANDT, C. T.; LEITE, C. R.; MANHAES-DE-CASTRO, R. et al. [Evaluation of the effect of splenectomy with autologous spleen tissue implantation in some monocyte functions in children with hepatosplenic schistosomiasis mansoni] **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.38 p.38-42, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Glossário Leishmaniose Ministério da Saúde**, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade/Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011

BREEL, M.; MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Dendritic cells of the mouse recognized by two monoclonal antibodies **Eur. J. Immunol.** v.17 p.1555-1559, 1987.

CABRERA, M. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** v.45 p.79-83, 2003.

CALDAS, A. J.; COSTA, J. M.; SILVA, A. A. et al. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in north-east Brazil **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.96 p.21-28, 2002.

CAMPOS-NETO, A.; BUNN-MORENO, M. M. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania* **Infect. Immun.** v.38 p.871-876, 1982.

CARDOSO, L.; NETO, F.; SOUSA, J. C. et al. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity **Vet. Parasitol.** v.79 p.213-220, 1998.

CARRION, J.; NIETO, A.; IBORRA, S. et al. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice **Parasite Immunol.** v.28 p.173-183, 2006.

CASSESE, G.; ARCE, S.; HAUSER, A. E. et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals **J. Immunol.** v.171 p.1684-1690, 2003.

CHAPLIN, D. D. Regulation of spleen white pulp structure and function by lymphotoxin **Adv. Exp. Med. Biol.** v.512 p.49-56, 2002.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.** v.5 p.873-882, 2007.

CHEVILLARD, C., OZAKI, J., HERRING, C.D., RIBLET, R.,. A three-megabase yeast artificial chromosome contig spanning the C57BL mouse Igh locus. **J. Immunol.** v.168, p.5659-5666, 2002.

CHU, V. T.; ENGHARD, P.; SCHURER, S. et al. Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus **Arthritis. Rheum.** v.60 p.2083-2093, 2009.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum* **Vet. Rec.** v.141 p.539-543, 1997.

CINAMON, G.; MATLOUBIAN, M.; LESNESKI, M. J. et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone **Nat. Immunol.** v.5 p.713-720, 2004.

COLLIN, S.; DAVIDSON, R.; RITMEIJER, K. et al. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan **Clin. Infect. Dis.** v.38 p.612-619, 2004.

CORBEIL, L. B.; WRIGHT-GEORGE, J.; SHIVELY, J. N. et al. Canine visceral leishmaniasis with amyloidosis: an immunopathological case study **Clin. Immunol. Immunopathol.** v.6 p.165-173, 1976.

CORREA, A. P.; DOSSI, A. C.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R. et al. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* **Vet. Parasitol.** v.143 p.267-274, 2007.

COSTA, C. H. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil **Cad. Saude Publica** v.24 p.2959-2963, 2008.

COSTA, C. H.; STEWART, J. M.; GOMES, R. B. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi* **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.66 p.334-337, 2002.

COSTA, C. H.; TAPETY, C. M.; WERNECK, G. L. [Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial] **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.40 p.415-419, 2007.

CYSTER, J. G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs **Science** v.286 p.2098-2102, 1999.

D'APUZZO, M.; ROLINK, A.; LOETSCHER, M. et al. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4 **Eur. J. Immunol.** v.27 p.1788-1793, 1997.

DA COSTA, C. A.; GENARO, O.; DE LANA, M. et al. [Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies] **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.24 p.21-25, 1991.

DANTAS-TORRES, F. [Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil] **Rev. Saude Publica** v.40 p.537-541, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDAO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** v.48 p.151-156, 2006.

DAVIDSON, R. N. Visceral leishmaniasis in clinical practice **J. Infect.** v.39 p.112-116, 1999.

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S. L. et al. Leishmaniasis: new approaches to disease control **B.M.J.** v.326 p.377-382, 2003.

DE CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; DE AQUINO, L. P. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings **Vet. Parasitol.** v.119 p.73-86, 2004.

DE LIMA, V. M.; PEIRO, J. R.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R. IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.115 p.189-193, 2007.

DE LUNA, R.; VUOTTO, M. L.; IELPO, M. T. et al. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum* **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.70 p.95-103, 1999,

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity **Biochim. Biophys. Acta** v.1455 p.341-352, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control **Clin. Dermatol.** v.14 p.417-423, 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.95 p.239-243, 2001.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v.97 Suppl 1 p.3-15, 2003.

DIAS, E. S.; BARATA, R. A.; FORTES-DIAS, C. L. et al. Morphometric and phenetic studies of five geographical populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) in Brazil **J. Med. Entomol.** v.36 p.846-850, 1999.

DKHIL, M. A. Apoptotic changes induced in mice splenic tissue due to malaria infection **J. Microbiol. Immunol. Infect.** v.42 p.13-18, 2009.

DOS-SANTOS, W. L.; DAVID, J.; BADARO, R. et al. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis **Parasitol. Res.** v.92 p.89-94, 2004.

DOS-SANTOS, W. L.; JESUS, E. E.; PARANHOS-SILVA, M. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.123 p.251-259, 2008.

DOS SANTOS, W. L.; RAHMAN, J.; KLEIN, N. et al. Control of lymphocyte adhesion to brain and aortic endothelium: ICAM-1, VCAM-1 and negative charge **J. Neuroimmunol.** v.66 p.125-134, 1996.

DOS-SANTOS, W. L. Desenvolvimento de testes baseados na resposta imune celular para identificação de cães infectados com leishmania e para a definição de resistência, susceptibilidade, e gravidade na leishmaniose visceral. Projeto submetido e aceito a FAPESB. 2013

DUNN-WALTERS, D. K.; BOURSIER, L.; CICLITIRA, P. J. et al. Immunoglobulin genes from human duodenal and colonic plasma cells are mutated **Biochem. Soc. Trans.** v.25 p.324S, 1997.

DUNN-WALTERS, D. K.; HACKETT, M.; BOURSIER, L. et al. Characteristics of human IgA and IgM genes used by plasma cells in the salivary gland resemble those used in duodenum but not those used in the spleen **J. Immunol.** v.164 p.1595-1601, 2000.

DUNN-WALTERS, D. K.; ISAACSON, P. G.; SPENCER, J. Sequence analysis of rearranged IgVH genes from microdissected human Peyer's patch marginal zone B cells **Immunology** v.88 p.618-624, 1996.

DUNN-WALTERS, D. K.; ISAACSON, P. G.; SPENCER, J. Sequence analysis of human IgVH genes indicates that ileal lamina propria

plasma cells are derived from Peyer's patches **Eur. J. Immunol.** v.27 p.463-467, 1997.

DUPREY, Z. H.; STEURER, F. J.; ROONEY, J. A. et al. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003 **Emerg. Infect. Dis.** v.12 p.440-446, 2006.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.55 p.125-130, 1996.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; COTTERELL, S. E. et al. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection **Am. J. Pathol.** v.161 p.429-437, 2002.

ENSERINK, M. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? **Science** v.290 p.1881-1883, 2000.

FAIRFAX, K. A.; KALLIES, A.; NUTT, S. L. et al. Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches **Semin. Immunol.** v.20 p.49-58, 2008.

FERROGLIO, E.; MAROLI, M.; GASTALDO, S. et al. Canine leishmaniasis, Italy **Emerg. Infect. Dis.** v.11 p.1618-1620, 2005.

FORATTINI, O. P.; PATTOLI, D. B.; SERRA, O. P. et al. [Note on cutaneous leishmaniasis on the South Coast of Sao Paulo State, Brazil] **Rev. Saude Publica** v.7 p.447-452, 1973.

FORSTER, R.; SCHUBEL, A.; BREITFELD, D. et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs **Cell** v.99 p.23-33, 1999.

FOX, C. H.; COTTLER-FOX, M. The pathobiology of HIV infection **Immunol. Today** v.13 p.353-356, 1992.

FRAGA, D. B.; SOLCA, M. S.; SILVA, V. M. et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: a 13 years survey and association with human disease **Vet. Parasitol.** v.190 p.591-594, 2012.

FREITAS, L. A. R. D.-S. Leishmanioses **Patologia** 7 edição 1359-1367 2006

FU, Y. X.; CHAPLIN, D. D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues **Annu. Rev. Immunol.** v.17 p.399-433, 1999.

GALVAO-CASTRO, B.; SA FERREIRA, J. A.; MARZOCHI, K. F. et al. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and

autoimmunity in human american visceral leishmaniasis **Clin. Exp. Immunol.** v.56 p.58-66, 1984.

GENARO, A. M.; BORDA, E. Alloimmune B-lymphocytes modify the myocardium contractility-inducing release of SRS-A **Int. J. Immunopharmacol.** v.10 p.563-568, 1988.

GORAK, P. M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection **Eur. J. Immunol.** v.28 p.687-695, 1998.

GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine **Vet. Parasitol.** v.100 p.87-103, 2001.

GRAYSON, M. H.; HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. et al. Intravital microscopy comparing T lymphocyte trafficking to the spleen and the mesenteric lymph node **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.** v.284 H2213-2226, 2003.

GUERRA, L. L.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C. et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis **Parasitol. Res.** v.104 p.611-622, 2009

GUNN, M. D.; KYUWA, S.; TAM, C. et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization **J. Exp. Med.** v.189 p.451-460, 1999.

HANSEN, K.; SINGER, D. B. Asplenic-hyposplenic overwhelming sepsis: postsplenectomy sepsis revisited **Pediatr. Dev. Pathol.** v.4 p.105-121, 2001.

HARGREAVES, D. C.; HYMAN, P. L.; LU, T. T. et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements **J. Exp. Med.** v.194 p.45-56, 2001.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis **Lancet** v.354 p.1191-1199, 1999.

HO, F.; LORTAN, J. E.; MACLENNAN, I. C. et al. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations **Eur. J. Immunol.** v.16 p.1297-1301, 1986.

INGOLD, K.; ZUMSTEG, A.; TARDIVEL, A. et al. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners **J. Exp. Med.** v.201 p.1375-1383, 2005.

JANOSSY, G., PINCHING, A. J., BOFILL, M., WEBER, J., MCLAUGHLIN, J. E., ORNSTEIN, M., IVORY, K., HARRIS, J. R.,

FAVROT, M. AND MACDONALD-BURNS, D. C., An immunohistological approach to persistent lymphadenopathy and its relevance to AIDS. **Clin. Exp. Immunol.** v.59 p.257-266, 1985.

JUNQUEIRA, L. C. U. C., J. Histologia Básica **Guanabara-Koogan - Rio de Janeiro** 8. ed 1995

KADIVAR, M. R.; KAJBAF, T. Z.; KARIMI, A. et al. Childhood visceral leishmaniasis complicated by bacterial infections **East. Mediterr. Health. J.** v.6 p.879-883, 2000.

KALLED, S. L. The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity **Immunol. Rev.** v.204 p.43-54, 2005.

KALLED, S. L.; AMBROSE, C.; HSU, Y. M. The biochemistry and biology of BAFF, APRIL and their receptors **Curr. Dir. Autoimmun.** v.8 p.206-242, 2005.

KAMPERDIJK, E. W.; VAN DEN BERG, M.; KAPSENBERG, M. et al. The relation between thymic interdigitating cells and dendritic cells **Adv. Exp. Med. Biol.** v.186 p.307-312, 1985.

KARAKANTZA, M.; THEODOROU, G. L.; MOUZAKI, A. et al. In vitro study of the long-term effects of post-traumatic splenectomy on cellular immunity **Scand. J. Immunol.** v.59 p.209-219, 2004.

KARLSSON, M. C.; GUINAMARD, R.; BOLLAND, S. et al. Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone **J. Exp. Med.** v.198 p.333-340, 2003.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology **Vet. Pathol.** v.21 p.80-86, 1984.

KLAUS, G. G.; HUMPHREY, J. H.; KUNKL, A. et al. The follicular dendritic cell: its role in antigen presentation in the generation of immunological memory **Immunol. Rev.** v.53 p.3-28, 1980.

KRAAL, G. Cells in the marginal zone of the spleen **Int. Rev. Cytol.** v.132 p.31-74, 1992.

KUPPERS, R.; ZHAO, M.; RAJEWSKY, K. et al. Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction **Am. J. Pathol.** v.143 p.230-239, 1993.

KUMAGAI K, YAMAGUCHI R, UCHIDA K, TATEYAMA S. Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. **J. Vet. Med. Sci.** v.66 p.175-181, 2004.

KYAW, M. H.; HOLMES, E. M.; TOOLIS, F. et al. Evaluation of severe infection and survival after splenectomy **Am. J. Med.** v.119 p.276 e271-277, 2006.

LAGE, R. S.; OLIVEIRA, G. C.; BUSEK, S. U. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi* **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.115 p.135-145, 2007.

LEFRANC, M.H P.,and G. R. LEFRANC. **The immunoglobulin facts book.** Academic Press, SanDiego; London 2001.

LIU, Y. J.; ZHANG, J.; LANE, P. J. et al. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens **Eur. J. Immunol.** v.21 p.2951-2962, 1991.

LIMA, S.I.; SILVA, J.S; ALMEIDA, V.A.; LEAL, F.G.J; SOUZA, A.N.; LARANGEIRA, D.F.; NETO, J.P.M; FRAGA, D.B.M.; FREITAS, L.A.R.; DOS-SANTOS, W.L.C. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLOS One.** v.9 p.87742, 2014.

MACKAY, F.; SCHNEIDER, P.; RENNERT, P. et al. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival **Annu. Rev. Immunol.** v.21 p.231-264, 2003.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M. et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.100 p.442-445, 2006.

MAIOLI, T. U.; CARNEIRO, C. M.; ASSIS, F. A. et al. Splenectomy does not interfere with immune response to *Leishmania major* infection in mice **Cell Immunol.** v.249 p.1-7, 2007.

MANCIANTI, F.; MECIANI, N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis **Am. J. Vet. Res.** v.49 p.1409-1411, 1988.

MARTINEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTINEZ-MORENO, F. J. et al. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.48 p.209-220, 1995.

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B.; CARVALHO, R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro **Parasitol. Today** v.10 p.37-40, 1994.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi* **Parasitol. Today** v.16 p.188-189, 2000.

MCCULLOUGH B, KRAKOWKA S, KOESTNER A. Experimental canine distemper virus-induced lymphoid depletion. **Am. J. Pathol.** v.74: p.155-170, 1974.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen **Nat. Rev. Immunol.** v.5 p.606-616, 2005.

MELBY, P. C.; TABARES, A.; RESTREPO, B. I. et al. Leishmania donovani: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection **Exp. Parasitol.** v.99 p.17-25, 2001.

MINGES WOLS, H. A.; IPPOLITO, J. A.; YU, Z. et al. The effects of microenvironment and internal programming on plasma cell survival **Int. Immunol.** v.19 p.837-846, 2007.

MINGES WOLS, H. A.; UNDERHILL, G. H.; KANSAS, G. S. et al. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity **J. Immunol.** v.169 p.4213-4221, 2002.

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

MUELLER, S. N.; AHMED, R. Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses **Immunol. Rev.** v.224 p.284-294, 2008.

NAGASE, H.; AGEMATSU, K.; KITANO, K. et al. Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis **Clin. Immunol.** v.100 p.250-259, 2001.

NASCIMENTO, M. S.; ALBUQUERQUE, T. D.; DO-VALLE-MATTA, M. A. et al. Naturally Leishmania infantum-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.153 p.202-208, 2013.

NASSIF, L. S.; REPKA, J. C.; NASSIF, A. C. et al. [Effects of splenectomy on peritonitis produced by a colonic injury: study in rats] **Rev. Assoc. Med. Bras.** v.50 p.268-271, 2004.

NGO, V. N.; CORNALL, R. J.; CYSTER, J. G. Splenic T zone development is B cell dependent **J. Exp. Med.** v.194 p.1649-1660, 2001.

O'CONNOR, B. P.; RAMAN, V. S.; ERICKSON, L. D. et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells **J. Exp. Med.** v.199 p.91-98, 2004.

OHL, L.; BERNHARDT, G.; PABST, O. et al. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs **Semin. Immunol.** v.15 p.249-255, 2003.

OSMAN, O. F.; KAGER, P. A.; OSKAM, L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects **Trop. Med. Int. Health** v.5 p.553-562, 2000.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO ADE, A. et al. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas **Vaccine** v.27 p.3505-3512, 2009.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MELRO, M. C. et al. Cohort study on canine emigration and Leishmania infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control **Acta Trop.** v.69 p.75-83, 1998.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum* **Infect. Immun.** v.62 p.229-235, 1994.

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P.; BRUYSTERS, M. et al. 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 **Infect. Immun.** v.67 p.237-243, 1999.

POECK, H.; WAGNER, M.; BATTIANY, J. et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help **Blood** v.103 p.3058-3064, 2004.

POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto) **Acta Trop.** v.38 p.383-393, 1981.

PREMVATI, G. Correlation of hyperplasia, splenomegaly and hepatomegaly with parasite population in BIO.LP-a mice infected with *Leishmania donovani* **J. Trop. Med. Hyg.** v.82 p.105-108, 1979.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. et al. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil **Parasitology** v.115 (Pt 2) p.143-156, 1997.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M. et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.91 p.161-168, 2003.

RAMANUJAM, M.; WANG, X.; HUANG, W. et al. Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE **J. Clin. Invest.** v.116 p.724-734, 2006.

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

REBELO, J. M. [Hourly frequency and seasonality of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) on Sao Luis Island, Maranhao, Brazil.] **Cad. Saude Publica** v.17 p.221-227, 2001.

REES, P. H.; KAGER, P. A.; KYAMBI, J. M. et al. Splenectomy in kala-azar **Trop. Geogr. Med.** v.36 p.285-292, 1984.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi* **Clin. Exp. Immunol.** v.146 p.303-311, 2006.

REIS, L. E.; COURA-VITAL, W.; ROATT, B. M. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection **Vet. Parasitol.** v.197 p.498-503, 2013.

REQUENA, J. M.; IBORRA, S.; CARRION, J. et al. Recent advances in vaccines for leishmaniasis **Expert. Opin. Biol. Ther.** v.4 p.1505-1517, 2004.

ROLDAN, E.; BRIEVA, J. A. Terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high-rate immunoglobulin secretion: role of bone marrow stromal cells and interleukin 6 **Eur. J. Immunol.** v.21 p.2671-2677, 1991.

ROSSI, E.; BONGIORNO, G.; CIOLLI, E. et al. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy **Acta Trop.** v.105 p.158-165, 2008.

ROURA, X.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique **Vet. Rec.** v.144 p.262-264, 1999.

RUIZ, F. L. E. A. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.41 p.263-270, 2005.

SANCHEZ, M. A.; DIAZ, N. L.; ZERPA, O. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi* **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.70 p.618-624, 2004.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs **Parasite Immunol.** v.30 p.515-524, 2008.

SANTOS-ORNELA, S. Padronização de métodos para análise da resposta imune órgão específica do baço de cães: uma contribuição ao estudo da leishmaniose visceral canina. **Dissertação de Mestrado** apresentada a Pós-graduação Veterinária Tropical, na área de Saúde animal da Universidade Federal da Bahia 2008.

SHAPIRO-SHELEF, M.; CALAME, K. Regulation of plasma-cell development **Nat. Rev. Immunol.** v.5 p.230-242, 2005.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control **J. Vector. Borne. Dis.** v.45 p.255-272, 2008.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PACHECO, R. S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.96 p.285-291, 2001.

SILVA, J. S.; ANDRADE, A. C.; SANTANA, C. C. et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis **PLoS One** v.7 p.e29103, 2012.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. et al. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.76 p.830-832, 1982.

SLIFKA, M. K.; ANTIA, R.; WHITMIRE, J. K. et al. Humoral immunity due to long-lived plasma cells **Immunity** v.8 p.363-372, 1998.

SMELT, S. C.; ENGWERDA, C. R.; MCCROSSEN, M. et al. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis **J. Immunol.** v.158 p.3813-3821, 1997.

SOLCA MDA, S.; GUEDES, C. E.; NASCIMENTO, E. G. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of Leishmania in spleen samples from naturally infected dogs **Vet. Parasitol.** v.184 p.133-140, 2012.

STEINIGER, B.; BARTH, P. Microanatomy and function of the spleen **Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.** 151 III-IX, 1-101, 2000

STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Dendritic cells: features and functions **Immunol. Rev.** v.53 p.127-147, 1980.

STEVENS DR, OSBURN BI. Immune deficiency in a dog with distemper. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.168 p.493-498, 1976.

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

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil **Vet. Parasitol.** v.96 p.203-212, 2001.

TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L.; BARBOSA, A. J. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** v.38 p.81-89, 1996.

TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; BECERRA, M. T. et al. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.92 p.275-278, 1998.

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

VAN DIJK, K.W., MORTARI, F., KIRKHAM, P.M., SCHROEDER JR., H.W., MILNER, E.C. The human immunoglobulin VH7 gene family consists of a small, polymorphic group of six to eight gene segments dispersed throughout the VH locus. **Eur. J. Immunol.** 23, 832-839 1993.

VAN ROOIJEN, N., CLAASSEN, E., KRAAL, G., AND DIJKSTRA, C.D. CYTOLOGICAL BASIS OF IMMUNE FUNCTIONS OF THE SPLEEN **PROGRAM HISTOCHEM. CYTOCHEM.** 10, 1989.

VAN ROOIJEN, N.; KORS, N. Specific antibody forming cells in lymphoid follicles of spleen: an aspect of the late immune response **Adv. Exp. Med. Biol.** v.237 p.221-225, 1988.

VERESS, B.; ABDALLA, R. E.; EL HASSAN, A. M. Visceral spreading depletion of thymus-dependent regions and amyloidosis in mice and hamsters infected intradermally with *Leishmania* isolated from Sudanese cutaneous leishmaniasis **Br. J. Exp. Pathol.** v.64 p.505-514, 1983.

VERESS, B.; OMER, A.; SATIR, A. A. et al. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis **Immunology** v.33 p.605-610, 1977.

WILSON, M. E.; STREIT, J. A. Visceral leishmaniasis **Gastroenterol. Clin. North. Am.** v.25 p.535-551, 1996.

WU, Y. C.; KIPLING, D.; LEONG, H. S. et al. High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations **Blood** v.116 p.1070-1078, 2010.

ZERPA, O.; ULRICH, M.; NEGRON, E. et al. Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela) **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.94 p.484-487, 2000.

ZUCKERMAN, A. Current status of the immunology of blood and tissue Protozoa. I. Leishmania **Exp. Parasitol.** v.38 p.370-400, 1975.

CAPÍTULO 8

ANEXOS

Neste capítulo estão anexados os trabalhos que foram publicados em revistas de indexação internacional durante o período do doutorado. O primeiro trabalho (SILVA et al, 2012) originou-se a partir de dados contidos no capítulo 2 dessa tese. Os outros trabalhos foram publicados em colaborações relacionadas à área de pesquisa em leishmaniose (LIMA et al, 2014, BATISTA et al, 2012) e Patologia (MARQUES et al, 2012).

Durante o período do doutorado, os dados obtidos com esta tese foram apresentados em congressos nacionais e internacionais, sendo premiado em dois destes:

1. Melhor apresentação oral no XXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Patologia e XXVIII Congreso de La Sociedad Latinoamericana (Maceió – AL, 2011)
2. Melhor apresentação oral em leishmaniose (Medalha de prata Aluizio Prata) no Encontro Aplicado à Pesquisa em Leishmaniose (Uberaba – MG, 2011)

Os trabalhos publicados estão listados abaixo:

SILVA, J. S.; ANDRADE, A.C.; SANTANA, C.C; Oliveira, C.I.; VERAS, P.S.T.; Vassalo, J.; DOS-SANTOS, W.L.C.. *Low CXCL13 Expression, Splenic Lymphoid Tissue Atrophy and Germinal Center Disruption in Severe Canine Visceral Leishmaniasis*. Plos One, v. 7, p. e29103, 2012.

LIMA, S.I.; **SILVA, J.S**; ALMEIDA, V.A.; LEAL, F.G.J; SOUZA, A.N.; LARANGEIRA, D.F.; NETO, J.P.M; FRAGA, D.B.M.; FREITAS, L.A.R.; DOS-SANTOS, W.L.C. *Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic*

white pulp. PLOS One. 2014

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

MARQUES, F.S.; **SILVA, J.S.**; COUTO, R.D.; JUNIOR, E.P.S.B.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; DOS-SANTOS, W.L.C.; SOARES, M.B.P. *Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Reduces Mortality and Improves Renal Function on Mercury-Induced Kidney Injury in Mice*. Renal Failure, v. 35, p. 776-781, 2012.