

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA`  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**MIOCARDIOPATIA EM CÃES NATURALMENTE  
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL:  
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E DA RESPOSTA  
IMUNE**

**Acácio Duarte Pacheco**  
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP  
2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**MIOCARDIOPATIA EM CÃES NATURALMENTE  
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL:  
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E DA RESPOSTA  
IMUNE**

**Acácio Duarte Pacheco**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Adjunto Mary Marcondes**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária – Unesp, Campus de  
Araçatuba, como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutor em Ciência  
Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

ARAÇATUBA – SP  
2016

Catálogo na Publicação(CIP)  
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Pacheco , Acácio Duarte

Miocardioptia em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral: aspectos histopatológicos e da resposta imune/ Acácio Duarte Pacheco. Araçatuba: [s.n], 2016.

52 f. il.; CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, 2016.

Orientador: Prof. Adjunto Mary Marcondes

1. Leishmania sp. 2. Citocinas. 3. Linfócitos T CD8+. 4. Linfócitos T CD4+. 5. Linfócitos B CD79+. I. T.

CDD: 614.49





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Miocardiopatia em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral: aspectos histopatológicos e da resposta imune

AUTOR: ACACIO DUARTE PACHECO

ORIENTADORA: MARY MARCONDES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARY MARCONDES  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. HEITOR FLÁVIO FERRARI  
Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Dra. FERNANDA MÜLLER DE OLIVEIRA ROVAI  
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

Araçatuba, 19 de julho de 2016.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ACÁCIO DUARTE PACHECO** – Nascido em Florianópolis em 12 de maio de 1985. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, em Lages, Santa Catarina (2008). Realizou o programa de residência em Clínica Médica, Cirúrgica e Anestesiologia de Pequenos Animais, com ênfase em Clínica Médica de Pequenos Animais, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, São Paulo (2009-2011). Mestre em Ciência Animal pelo programa Pós-graduação em Ciência Animal, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, São Paulo (2013). Ingresso no programa de pós-graduação, Doutorado, em 2013 na mesma instituição. Atuou como professor substituto na Disciplina de Clínica Médica de Pequenos Animais nos anos de 2015 e 2016, também na Faculdade de Medicina Veterinária, Câmpus de Araçatuba.

## DEDICATÓRIA

À minha mãe (Rozete Duarte Pacheco), por todo apoio durante o período em que estive longe. Maior exemplo a ser seguido, não há!  
Te amo muito.

A Juliana Tessália Wagatsuma (Jú), pelo amor e companheirismo durante essa caminhada.  
Te amo! Que nossos caminhos continuem juntos por mais mil anos!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Mary Marcondes, por todos estes anos de confiança que me foram depositados, durante a residência, mestrado e agora no doutorado. O período de convivência foi longo, afinal de contas, foram sete anos trabalhando juntos. Espero que eu consiga ser, para os meus orientados, a milésima parte do que você foi como orientadora durante todo esse período. Sou extremamente grato por tudo que você fez por mim. Apesar da distância ficar um pouco maior, sei que poderei contar com você sempre que precisar! Nunca deixarei de ser seu orientado e me orgulho muito disso! Você é excepcional!

Aos meus pais Rozete e Irany, que nunca mediram esforços para que esse sonho se concretizasse. O caminho de vocês não foi fácil, nunca me esquecerei disso. Espero ter retribuído um pouco às expectativas que vocês depositaram em mim, como filho e profissional! Amo muito vocês!

A Jú, não tenho palavras para expressar o que você significa para mim. Todos estes anos de companheirismo, principalmente nas horas difíceis foi o que muitas vezes não permitiu que eu desistisse! Nossos momentos bons ainda não terminaram, tenho certeza que nosso caminho junto será de plena felicidade! Te amo muito!

Aos meus irmãos (Felipe e Bruna), tenho que agradecer por estarem sempre ao meu lado. A Bruna, que acabou seguindo o caminho da veterinária, fico extremamente orgulhoso de ver a profissional que você se tornou. Amo muito vocês.

A minha nova família, Masaro (sogrão), Maria José (tesourinho) e Maria Paula, muito obrigado por tudo. Fico muito feliz por saber que tenho vocês ao meu lado. Amo vocês!

Aos meus amigos Flávia, Fernanda Müller, Karina, Daniel, Heitor, Analy, Tati Frate por todo o companheirismo durante essa jornada em Araçatuba. Ter a amizade de vocês foi o que tornou todo esse período inesquecível.

Ao Setor de Patologia da FMVA pelo auxílio no processamento das amostras, muito obrigado. À professora Maria Cecília pela ajuda durante a leitura das lâminas, assim como ao Heitor e a Tawane pela leitura das lâminas de HE e auxílio na padronização das imunohistoquímicas.



Ao Prof. Wagner por todo o conhecimento repassado durante todo esse período, desde a residência até o final da pós-graduação. Muito obrigado pela oportunidade de poder aprender a melhorar cada vez mais, pessoalmente e profissionalmente.

Ao Laboratório de Moléstias Infecciosas (LIM-50) da Faculdade de Medicina da USP, especialmente à Prof. Márcia Dalastra e a Thay, por toda a amizade e auxílio no processamento dos miocárdios e realização das imunos e da quantificação das citocinas!

A FMVA por toda a oportunidade de aprendizado durante este período de crescimento profissional.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de mestrado e doutorado, assim como pelo auxílio do projeto durante o doutorado.

Ao CNPQ pela bolsa de doutorado durante o início do curso de pos-graduação.

E por último, porém não menos importante, à Deus, por me proporcionar toda essa jornada!

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.	MATERIAIS E MÉTODO.....	11
3.1	Animais.....	11
3.2	Delineamento Experimental.....	11
3.3	Exame Citológico de linfonodo e medula óssea.....	14
3.4	Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> sp.....	14
3.5	Pesquisa de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> e antígenos de <i>Dirofilaria immitis</i> .....	14
3.6	Exame histopatológico do músculo cardíaco.....	15
3.7	Reação de imuno-histoquímica para pesquisa de <i>Leishmania</i> sp., linfócitos T CD4+, CD8+, linfócitos B CD79+, IgG, óxido nítrico sintetase e MMP-2.....	15
3.8	Quantificação das citocinas IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ pela técnica de ELISA.....	17
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
5.	RESULTADOS.....	19
5.1	Alterações histopatológicas no miocárdio.....	22
5.2	Imunomarcação de <i>Leishmania</i> sp.....	24
5.3	Imunomarcação de Linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B CD79+, IgG, INOS e MMP-2.....	26
5.4	Quantificação de citocinas IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ pela técnica de ELISA.....	33
6.	DISCUSSÃO.....	41
7.	CONCLUSÃO.....	48
8.	REFERÊNCIAS.....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Intensidade de infiltrado inflamatório na parede livre de átrio direito (AD), parede livre de ventrículo direito (VD), septo interventricular (SIV) e parede livre de ventrículo esquerdo (VE) do miocárdio de 20 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. Número absoluto e porcentagem de fragmentos avaliados. (Araçatuba-SP, 2016).....	<b>22</b>
---	-----------

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia de linfonodo poplíteo de um cão com leishmaniose visceral. Observa-se a presença de inúmeras formas amastigotas típicas de *Leishmania* sp. no interior do macrófago e outras formas também fora da célula (Objetiva de 100X). Araçatuba, 2016..... 13
- Figura 2.** Quadro com os diferentes anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica no miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV ..... 16
- Figura 3.** Gráfico de dispersão dos valores de D.O. obtidos pela técnica de ELISA para *Leishmania* sp. A linha vermelha indica o ponto de corte da reação (0,193), sendo os pontos contidos acima da linha, dos animais com sorologia considerada reagente para doença (GL). Já os valores abaixo indicam a D.O. dos animais inseridos no grupo controle (GC), que apresentaram os demais exames para doença também considerados negativos..... 19
- Figura 4.** Sinais clínicos observados em cães naturalmente acometidos por LV durante a realização da coleta dos materiais para o desenvolvimento do projeto de pesquisa. A – Onicogribose; B – hiperqueratose de espelho nasal; C – descamação em pavilhão auricular; D – lesões ulcerativas palpebrais. Araçatuba, 2016..... 20
- Figura 5.** Ocorrência dos diferentes sinais clínicos observados nos cães avaliados durante o desenvolvimento do presente estudo, para a avaliação das alterações no miocárdio de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. Araçatuba, 2016..... 22
- Figura 6.** Fotomicrografia do miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, coloração de HE. (A) Região de átrio direito de cão apresentando infiltrado inflamatório mononuclear moderado, aumento de 10X. (B) Miocárdio com infiltrado inflamatório mononuclear. Região de ventrículo direito com infiltrado inflamatório mononuclear discreto (C).

	(D) Região de átrio direito com infiltrado inflamatório mononuclear acentuado.....	23
<b>Figura 7.</b>	Fotomicrografia da imunomarcção de <i>Leishmania</i> sp. no AD de um cão naturalmente acometidos por LV (Objetiva de 100X). As setas indicam a presença da imunomarcção do parasito no tecido avaliado (Araçatuba, 2016).....	25
<b>Figura 8.</b>	Fotomicrografia da imunomarcção de linfócitos T CD4+ no VD de um cão naturalmente acometidos por LV (Objetiva de 40X; Araçatuba, 2016).....	27
<b>Figura 9.</b>	Fotomicrografia da imunomarcção de linfócitos T CD8+ no AD de um cão naturalmente acometidos por LV (Objetiva de 40X; Araçatuba, 2016).....	28
<b>Figura 10.</b>	Imunomarcção de Linfócitos B CD79+ no infiltrado inflamatório (discreto) do miocárdio de cão naturalmente acometido por LV(Objetiva de 40X). Araçatuba, 2016. As setas indicam as células imunomarcadas.....	29
<b>Figura 11.</b>	Imunomarcção de IgG no infiltrado inflamatório (discreto) do miocárdio de cão naturalmente acometido por LV (Objetiva de 40X; Araçatuba, 2016).....	30
<b>Figura 12.</b>	Imunomarcção de INOS no infiltrado inflamatório (discreto) no miocárdio de cão naturalmente acometidos por LV (Objetiva de 40X; Araçatuba, 2016).....	31
<b>Figura 13.</b>	Fotomicrografia da imunomarcção de MMP-2 no miocárdio de cão naturalmente acometido por LV (Aumento de 40X; Araçatuba, 2016).....	32
<b>Figura 14.</b>	Boxsplot das quantificações de IL-4 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV. Diferença estatística significativa foi evidenciada somente entre os grupos GP e GC ( $p < 0,05$ ). Entretanto, quando se comparou os demais grupos entre si, diferença significativa não foi detectada ( $p > 0,05$ ).....	34
<b>Figura 15.</b>	(A) Boxsplot das quantificações de IL-7 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, comparando-se os fragmentos dos animais infectados com o	

- grupo controle, sem diferença significativa ( $p>0,05$ ). (B) Comparação dos fragmentos de cães com LV, comparado ao grupo controle, somente na região do AD, que apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p<0,05$ ), porém a produção foi inferior nos animais infectados (GL) quando comparado a controle..... 35
- Figura 16.** Boxsplot das quantificações de IL-10 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, comparando-se os fragmentos dos animais infectados com o grupo controle, sem diferença significativa ( $p>0,05$ )..... 36
- Figura 17.** (A) Boxsplot das quantificações de IL-12 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, comparando-se os fragmentos dos animais infectados com o grupo controle, com diferença significativa ( $p=0,002$ ). (B) Boxsplot das quantificações de IL-12 dos animais infectados com parasito (GP) e sem parasito no miocárdio (GSP) em relação ao grupo controle, com diferença significativa somente entre os animais infectados sem parasito e o grupo controle ( $p<0,05$ )..... 37
- Figura 18.** Boxsplot das quantificações de IL-15 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV comparados ao grupo controle, não sendo observado diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ )..... 38
- Figura 19.** (A) Boxsplot das quantificações de IFN- $\gamma$  nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, comparando-se os fragmentos dos animais infectados com o grupo controle, com diferença significativa ( $p=0,002$ ). (B) Boxsplot das quantificações de IFN- $\gamma$  dos animais infectados com parasito (GP) e sem parasito no miocárdio (GSP) em relação ao grupo controle, com diferença significativa somente entre os animais infectados sem parasito e o grupo controle ( $p<0,05$ )..... 39
- Figura 20.** Boxsplot das quantificações de TNF- $\alpha$  nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV comparados ao grupo controle, não sendo observado diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ )..... 40

## MIOCARDIOPATIA EM CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E DA RESPOSTA IMUNE

**RESUMO** – A ocorrência de miocardite em cães naturalmente acometidos por *Leishmania infantum chagasi* tem sido demonstrada em estudos recentes, contudo o tipo de resposta imune incitada no tecido cardíaco de cães com leishmaniose visceral (LV) ainda não foi determinada. Sendo assim, foram avaliados fragmentos da: parede livre de átrio direito (AD), parede livre de ventrículo direito (VD), parede livre de ventrículo esquerdo (VE) e septo interventricular (SIV) de 20 cães naturalmente acometidos por LV para determinação das alterações histopatológicas e da resposta imune no tecido cardíaco. A presença de miocardite foi observada em 75% dos animais avaliados, sendo o infiltrado inflamatório do tipo linfoplasmocitário a alteração mais comum nesses fragmentos. A imunomarcção de *Leishmania* spp. foi observada em 60% dos animais. Não houve correlação entre a intensidade do infiltrado inflamatório e a presença de *Leishmania* sp. no miocárdio ( $p=0,0682$ ). A imunomarcção do parasito apresentou correlação com a presença de linfócitos T CD4+ ( $p<0,0001$ ) e T CD8+ ( $p=0,0002$ ), linfócitos B CD79+ ( $p=0,046$ ) e IgG ( $p=0,040$ ). Os níveis de IL-4 ( $p=0,030$ ), IL-12 ( $p=0,002$ ), IFN- $\gamma$  ( $p<0,0001$ ) foram menores em cães infectados em relação ao grupo controle, independente da presença ou não do parasito no miocárdio ( $p>0,05$ ). No presente estudo, a presença de alterações miocárdicas, associadas a resposta imunológica mista foram comuns em cães com LV. Novos estudos avaliando paralelamente, a presença de inflamação miocárdica e o perfil de citocinas no tecido cardíaco, à resposta imunológica sistêmica são indicados para confirmação da resposta imunológica presente no miocárdio de cães acometidos por LV.

**Palavras-chave:** *Leishmania* sp.; Citocinas; Linfócitos T CD8+; Linfócitos T CD4+; Linfócitos B CD79+

## **MIOCARDIOPATHY IN DOGS NATURALLY AFFECTED BY VISCERAL LEISHMANIASIS: HISTOPATHOLOGICAL PATTERNS E IMMUNE RESPONSE EVALUATION**

**ABSTRACT** – Recent studies have demonstrated the occurrence of myocarditis in dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*, however the type of immune response in cardiac tissue of dogs with visceral leishmaniasis (VL) has not been determined. For this purpose, fragments from right atrial free wall (AD), right ventricular free wall (RV), left ventricular free wall (LV) and interventricular septum (IVS) of 20 dogs naturally affected by VL were evaluated to determine the histopathological changes and the immune response in heart tissue. The presence of myocarditis has been reported in 75% of the evaluated animals, and an lymphoplasmocytic inflammatory infiltrate was the most common change in these fragments. The immunostaining of *Leishmania* sp. was observed in 60% of the evaluated animals. There was no correlation between the intensity of the inflammatory infiltrate and the presence of *Leishmania* sp. ( $p = 0.0682$ ). The immunostaining of the parasite correlated with the presence of CD4 + ( $p < 0.0001$ ) and CD8 + T lymphocytes ( $p = 0.0002$ ), CD79 + B lymphocytes ( $p = 0.046$ ) and IgG ( $p = 0.040$ ). IL-4 ( $p = 0.030$ ), IL-12 ( $p = 0.002$ ) and IFN- $\gamma$  levels ( $p < 0.0001$ ) were lower in the infected dogs when compared to control group, regardless of the presence or absence parasite in the myocardium ( $p > 0.05$ ). The results obtained in this study suggest that the presence of myocardial changes is common in dogs with VL, associated with a mixed immune response in heart tissue. However, the local inflammatory process seems not enough to trigger the production of cytokines normally involved in VL, possibly due to a low parasite load in dogs myocardium, especially when compared to other organs such as spleen, liver and bone marrow. Further studies evaluating at the same time the presence of myocardial inflammation and the behavior of these circulating cytokines in target organs with immune activity are indicated to confirm the immune response present in the myocardium of dogs affected by VL.

**Key-words:** *Leishmania* sp.; cytokines; T CD8+ lymphocytes; T CD4+ lymphocytes; B CD79+ lymphocytes



## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose mundialmente distribuída, sendo a *Leishmania* spp. o agente etiológico envolvido nas diversas formas da doença. O cão é considerado o principal hospedeiro no ambiente doméstico e a infecção na espécie canina geralmente precede a ocorrência no homem. Em função da variedade de sinais clínicos observados nos animais com a doença e do tipo de resposta imunológica incitada no início da infecção, o diagnóstico muitas vezes é de difícil realização, uma vez que todos os exames podem resultar negativos, na dependência da resposta desenvolvida naquele paciente no momento da avaliação.

Após a inoculação do parasito pelo flebotomíneo, os macrófagos atuarão como células apresentadoras de antígenos para os linfócitos T CD4+ e, na dependência das interleucinas (IL) liberadas no início do processo, pode-se desenvolver uma resposta do Th1 ou protetora, principalmente mediante a liberação de citocinas como a IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , inibindo dessa forma a replicação do agente e o desenvolvimento dos sinais clínicos. Em contrapartida, se houver uma liberação maior de IL-4, conseqüentemente ocorre uma tendência ao desenvolvimento de uma resposta Th2 ou não-protetora, com estimulação de linfócitos B e produção de anticorpos, que não apresentam atividade contra a replicação do parasito, ocorrendo conseqüentemente a replicação do mesmo nos tecidos e, o desenvolvimento da doença.

Os principais sinais clínicos observados na LV estão relacionados a ocorrência de lesões cutâneas, oftálmicas, onicogribose, emagrecimento progressivo e linfadenomegalia. A principal causa de morte na doença ocorre quando estes pacientes desenvolvem um quadro de doença renal crônica, limitando desta forma a expectativa de vida dos animais.

Apesar de a lesão renal ser uma importante causa de óbito em cães, a ocorrência de alterações cardíacas tem sido descrita em cães e humanos com LV.

Mesmo com a presença de alterações histopatológicas observadas nos tecidos miocárdicos desses pacientes, sinais clínicos associados à distúrbios cardiovasculares têm sido raramente descritos. A presença do parasito tem sido associada a intensidade de inflamação e ocorrência das lesões em alguns estudos, entretanto sua ausência, na presença de alterações histopatológicas, tem confrontado esta possibilidade, sugerindo assim, a participação da resposta humoral na ocorrência da miocardite em cães.

Até onde é de nosso conhecimento, a avaliação do perfil de citocinas envolvidas na LV, no miocárdio de cães não fora descrito, apesar de um recente estudo ter identificado a presença de linfócitos T e B no infiltrado inflamatório do miocárdio desses animais. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivos avaliar a presença de alterações histopatológicas e elucidar a resposta imunológica envolvida no miocárdio de cães naturalmente acometidos por *Leishmania infantum chagasi*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Calazar, é uma zoonose causada por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*, que infectam o cão e uma ampla variedade de vertebrados, incluindo o homem, com larga distribuição nas regiões tropicais e subtropicais (KONTOS; KOUTINAS, 1993; BANETH et al., 2008). A *Leishmania chagasi*, principal agente etiológico da LV na América do Sul, é um protozoário pertencente ao complexo *Leishmania donovani*, no qual estão incluídas as três principais espécies causadoras da leishmaniose visceral, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. donovani* (BADARO, 1996; SHERLOCK, 1996). Estima-se que a incidência anual de LV em seres humanos seja próxima a 500.000 casos (DESJEUX, 2004). Apenas no Brasil aproximadamente 3.500 casos de LV são relatados anualmente, dos quais estimam-se que cerca de 10% venham a óbito (DANTAS-TORRES, 2009).

Os vetores implicados na transmissão das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos. A espécie de maior importância nas Américas é a *Lutzomyia longipalpis*, conhecida popularmente no Brasil como mosquito-palha, birigui ou tatuquira (BRASIL, 2003). Quando as fêmeas infectadas dos flebotomíneos alimentam-se em hospedeiros susceptíveis, as formas promastigotas são inoculadas juntamente à saliva do inseto. A inoculação do parasita na pele promove uma resposta inflamatória local, levando à sua fagocitose por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos. No interior dos macrófagos, as formas promastigotas perdem o flagelo, diferenciando-se em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias. As células densamente parasitadas rompem-se, liberando as formas amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre, assim, a disseminação hematogênica e linfática do parasita. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, durante o

repasto sanguíneo em mamífero infectado, ingerem macrófagos parasitados (MICJALICK; GENARO, 2007).

Em camundongos inoculados com *Leishmania* sp. demonstrou-se que os macrófagos infectados atuam como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T do tipo CD4+. Estes são estimulados a produzir interleucinas e, dependendo do perfil incitado, ocorre desenvolvimento de duas subpopulações de linfócitos T auxiliares, Th1 ou Th2. Além de agirem como células apresentadoras de antígenos no início da resposta imune, os macrófagos afetam o curso da infecção secretando interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), que aumentam a eficiência de fagócitos e de linfócitos citotóxicos (PINELLI et al., 1994; ABBAS et al., 2008).

Quando ativadas, as células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), as interleucinas IL-2, IL-6 e IL-12, e o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos. Esses radicais livres são tóxicos para os parasitos, podendo levar ao controle do parasitismo com eliminação da infecção. A IL-12, liberada no início do processo inflamatório, desempenha um papel crucial no controle da doença, já que influencia a resposta imune inata e a subsequente ativação de células T CD4+ do tipo Th1 (PINELLI et al., 1994; WEAVER et al., 2007; ABBAS et al., 2008).

Por outro lado, quando a infecção induz a uma resposta com linfócitos Th2, há síntese de citocinas anti-inflamatórias como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, bem como o fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), com subsequente proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos (MARTÍNEZ-MORENO et al., 1995; SANTOS-GOMES et al., 2002; WEAVER et al., 2007). A produção de anticorpos, principalmente IgG, é muito elevada e promove mais danos do que proteção ao hospedeiro, devido à formação de grande quantidade de complexos imunes circulantes que se depositam em vários órgãos e tecidos (PINELLI et al.,

1994; ABBAS et al., 2008).

Os sinais clínicos da leishmaniose visceral canina variam em decorrência dos mecanismos imunológicos ativados pelo hospedeiro, bem como dos órgãos acometidos, o que dificulta, muitas vezes, o diagnóstico clínico da doença. Geralmente animais infectados apresentam emagrecimento progressivo, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, atrofia muscular, anemia e lesões cutâneas. São frequentes as lesões renais e oftálmicas, no entanto, cães acometidos podem também apresentar alterações digestórias, locomotoras e neurológicas (FEITOSA et al., 2000; BANETH et al., 2008; MELO et al., 2009; BANETH; SOLANO-GALLEGO, 2012).

Até onde é de nosso conhecimento, sintomas decorrentes de lesões cardíacas em cães com leishmaniose visceral foram descritos na literatura apenas em dois casos (FONT et al, 1993; ZABALA et al, 2005). Outros poucos relatos descrevem as alterações histopatológicas do miocárdio de cães, entretanto em animais que não desenvolveram sinais clínicos de comprometimento deste órgão (AJELLO & CATARSINI, 1976; TORRENT et al., 2005; LÓPEZ-PEÑA et al., 2009; SILVA et al., 2009). Um único estudo com um número maior de animais relata a presença de infiltrado inflamatório discreto a moderado em 22 cães com a doença sem, no entanto, descrever a exata localização deste processo no miocárdio (ALVES et al., 2010).

A presença do parasita no tecido cardíaco foi descrita em poucos relatos de casos (FONT et al., 1993; TORRENT et al., 2005; LÓPEZ-PEÑA et al., 2009; SILVA et al., 2009), e em um cão (8.4%) dos 12 cães com leishmaniose visceral avaliados por meio de imunohistoquímica por Alves e colaboradores (2010).

Os primeiros estudos realizados em corações de seres humanos com LV datam de 1988, quando Moraes e colaboradores, ao avaliarem o miocárdio de 16 seres humanos acometidos, verificaram alterações histopatológicas que se caracterizaram pela presença de edema intersticial associado à infiltração focal de células inflamatórias e discreto foco de necrose de cardiomiócitos, porém sem a

presença de formas amastigotas do parasita. O comprometimento cardíaco foi pouco intenso, o que levou os autores a utilizarem o termo “miocárdio reacional” (MORAIS et al., 1988).

De forma semelhante ao que ocorre em cães, o envolvimento cardíaco em seres humanos com leishmaniose visceral também já foi descrito, principalmente em relatos de casos de efusão pleural (MARCOS SÁNCHEZ et al., 1989; MOFREDJ et al., 2002; PUERTO-ALONSO et al., 2006; SHRIVASTAVA et al., 2007). Se conseqüente a lesão cardíaca ou a hipoalbuminemia secundária a leishmaniose visceral, a etiologia da efusão pericárdica permanece incerta (SHRIVASTAVA et al., 2007).

Apesar dos relatos de envolvimento cardíaco em cães com leishmaniose visceral ser raro, um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa com 30 cães sintomáticos, sem evidências clínicas de comprometimento da função cardíaca, revelou alterações histopatológicas no miocárdio de todos eles. O achado mais frequente foi a presença de um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, observado em 90% dos animais, em maior intensidade no átrio direito. Necrose de cardiomiócitos e presença de fibrose, principalmente no átrio direito, foram observadas em 80% e 73.3% dos cães, respectivamente. Também foram visualizados granulomas lepromatosos difusos e infiltração gordurosa no tecido miocárdico. Diferente de estudos anteriores, formas amastigotas do parasita foram observadas no miocárdio de 20/30 (66.7%) cães, sugerindo uma participação do parasita no desenvolvimento das lesões. Entretanto, não foram avaliadas outras células que poderiam estar participando na patogênese da lesão (ROSA et al., 2014).

Já em um estudo recentemente publicado foi avaliado a presença de linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+ e linfócitos B CD79+ no miocárdio de 15 cães naturalmente acometidos por LV, sendo que o autor encontrou uma maior proporção de subpopulações de linfócitos T no miocárdio desses animais, porém a presença de linfócitos B também esteve presente em alguns fragmentos avaliados, em menor

proporção (COSTAGLIOLI et al., 2016). As alterações histopatológicas encontradas foram semelhantes as previamente descritas em outros estudos prévios (TORRENT et al., 2005; LÓPEZ-PEÑA et al., 2009; SILVA et al., 2009; ROSA et al., 2014; COSTAGLIOLI et al., 2016) sendo o infiltrado linfoplasmocitário observado com maior frequência. Apesar da incidência de alterações em todos os fragmentos avaliados, a presença do parasito não foi confirmada em nenhum fragmento, divergindo dos achados de Rosa e colaboradores (2014), que correlacionou a presença do parasito com as alterações observadas.

Na tentativa de elucidar a patogenia da doença, a imunomarcaçãõ de leishmanias, linfócitos, imunoglobulinas e macrófagos tem sido avaliada em alguns estudos realizados em cães portadores de leishmaniose visceral (VAMVAKIDIS et al., 2000; TAFURI et al., 2004; MELO, 2005; LARANGEIRA, 2008; TORRES-NETO et al., 2008). Os linfócitos expressam um grande número de imunomarcadores em suas membranas, os quais podem ser utilizados para distinguir várias subpopulações celulares. Enquanto as moléculas CD3+ encontram-se presentes em todas as subespécies de linfócitos T, o CD4+ pode ser observado em receptores de células T auxiliares, neutrófilos e macrófagos, e o CD8+ em receptores de linfócitos T citotóxicos (ROITT et al., 1993).

O receptor de linfócitos B consiste de imunoglobulinas de superfície ligadas a moléculas, como o CD79+. As moléculas CD21+ são expressas em linfócitos B maduros e células dendríticas foliculares, atuam como receptor para o componente C3d do complemento e formam um co-receptor para o reconhecimento antigênico das células B (JANEWAY et al., 2007). Ainda, a imunomarcaçãõ de IgG também pode auxiliar na identificação indireta das células B (ROITT; DELVES, 2004). A detecção destas células em tecidos de animais infectados permite determinar se a resposta imunológica desenvolvida é do tipo celular ou humoral (TORRES-NETO et al., 2008).

Outra enfermidade que poderia servir de modelo para o estudo da lesão cardíaca na leishmaniose visceral é a doença de Chagas, também causada por um

triplanossomatídeo, que leva ao desenvolvimento de uma cardiomiopatia. Cunha-Neto e colaboradores (1996) verificaram que as células T infiltradas no miocárdio exerciam uma função primordial no dano tecidual, sem, entretanto, conseguirem determinar a natureza dos antígenos alvo dentro do coração. A ausência de parasitas próximos a áreas de infiltrado inflamatório destrutivo em tecido cardíaco infectado sugeria que a lesão inflamatória no coração fosse de natureza auto-imune, possivelmente envolvendo uma imitação antigênica entre os antígenos do *Trypanossoma cruzi* e os antígenos cardíacos. Cunha-Neto e colaboradores (1996) demonstraram pela primeira vez uma reação imunológica cruzada entre um antígeno de *Trypanossoma cruzi* (B13) e um epítipo do cardiomiócito. Os dados desse trabalho sugerem fortemente a relevância dessa “imitação molecular” entre miosina cardíaca e proteína B13 do *Trypanossoma cruzi* na patogênese da lesão cardíaca na doença de Chagas.

O desenvolvimento da lesão cardíaca nos pacientes cronicamente acometidos pela doença pode ser justificado ainda por níveis reduzidos de células T regulatórias em pacientes. Os infiltrados cardíacos de células T na doença de Chagas demonstram uma relação de 2:1 entre o CD8+ e o CD4+ sugerindo que há uma participação da citotoxicidade no dano cardíaco (FONSECA et al., 2007). Os fatores que levam um acúmulo de TCD8+ no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia chagásica ainda é desconhecido. Pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica possuem uma relação IL-15/CD68+ aumentada, sugerindo que macrófagos CD68+ são induzidos a produzir IL-15 devido ao processo inflamatório. Esta, por sua vez, contribui para um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o IFN- $\gamma$  e o TNF, observados no tecido cardíaco da cardiomiopatia chagásica crônica. A IL-15 é necessária para a manutenção das células TCD8+ de memória por longos períodos e desenvolvimento de células natural killer. A IL-15 pode agir em sinergismo com a IL-12 para produção de IFN- $\gamma$  e em sinergismo com a IL-7 para aumentar a habilidade das células TCD8+ e CD4+



em produzir IFN- $\gamma$ . Mais ainda, o IFN- $\gamma$  por si só induz à expressão de IL-15 (FONSECA et al., 2007).

Essa hipótese é reforçada por estudos pretéritos que demonstraram uma predominância de células mononucleares marcadas para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia chagásica (REIS et al., 1993; REIS et al., 1997). Finalmente, há que se considerar que os linfócitos CD4+ e CD8+ geram a produção de IFN- $\gamma$  o qual age sinergicamente com o TNF- $\alpha$  para ativar a expressão da óxido nítrico sintetase (NOS<sub>2</sub>), enzima responsável por produção de quantidades elevadas de óxido nítrico pelo cardiomiócito. A produção de óxido nítrico é necessária para a morte intracelular do parasita, porém, sua síntese também pode danificar o miocárdio (MACHADO et al., 2008).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são um grupo de enzimas proteolíticas zinco-dependentes que possuem como principais funções a manutenção da matriz extracelular e a remodelação tecidual durante processos fisiopatológicos, auxiliando, desta maneira, na resposta imune do hospedeiro frente à infecção, facilitando o recrutamento leucocitário e a liberação de citocinas (Visse; Nagase, 2003). Apesar de apresentarem função protetora frente a diversos agentes agressores, estudos tem demonstrado que um aumento dos níveis das metaloproteinases quando da ocorrência de enfermidades infecciosas facilitam a disseminação do agente no hospedeiro (OPDENAKKER et al., 2001; ELKINGTON et al., 2005).

Gutierrez e colaboradores (2008) ao avaliaram os níveis de MMPs no miocárdio de ratos experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* demonstraram que os animais tratados com inibidores das MMPs apresentaram, ao exame histopatológico, níveis reduzidos de MMPs no tecido cardíaco, redução da inflamação, maior tempo de sobrevivência e pico parasitêmico retardado quando comparado ao grupo não tratado. Tais resultados sugerem, desta forma, que uma exacerbação da resposta inflamatória pelo aumento dos níveis de MMPs, neste

caso MMP-2 e MMP-9, podem contribuir para a evolução da lesão cardíaca na fase aguda de doença de Chagas.

A participação das MMP's na patogênese da lesão cardíaca de cães com LV ainda não foi investigada. Até onde é de nosso conhecimento, os únicos trabalhos realizados na tentativa de determinar o papel dessas enzimas na doença foram realizados no sistema nervoso de cães naturalmente infectados, por nosso grupo de pesquisa. Aumentos dos níveis de MMP-2 e MMP-9 foram observados no liquor, soro e sistema nervoso central, sugerindo que estas estão associadas a patogênese da doença nesses locais (MACHADO et al., 2010; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2011).

### **3. Materiais e Método**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados 20 cães com idade superior a seis meses, independente do sexo e da raça, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, encaminhados ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Araçatuba. Somente foram utilizados cães provenientes do município de Araçatuba – SP, área endêmica para a leishmaniose visceral e não-endêmica para doença de Chagas (UMEZAWA et al., 2009; CVE, 2005), e que não apresentaram histórico de deslocamento para outras regiões. Um grupo controle foi composto por cinco cães sem a enfermidade, que vieram a óbito por doenças não infecciosas ou que levassem a alterações cardíacas.

O diagnóstico da leishmaniose visceral foi fundamentado nos resultados do exame parasitológico direto realizado em citologia de punção biópsia aspirativa de linfonodo ou medula óssea. A pesquisa de anticorpos séricos anti-*Leishmania* sp. também foi realizada, pela técnica de ELISA, assim como a pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e de antígenos de *Dirofilaria immitis*. Os casos com resultados positivos para *E. canis* e *D. immitis* foram descartados do experimento, uma vez que estas enfermidades podem levar ao desenvolvimento de lesões cardíacas.

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) sob protocolo nº FOA – 00463/2013.

#### **3.2. Delineamento Experimental**

Após o diagnóstico da doença os animais foram submetidos ao exame físico geral de acordo com Feitosa (2008), seguido de exame físico específico do sistema cardiovascular segundo Camacho e Mucha (2008).

Com o consentimento esclarecido de seus proprietários os cães infectados

foram tranquilizados com acepromazina na dose de 0,05 mg/kg, por via intramuscular. Decorridos 15 minutos, foram anestesiados com tiopental sódico na dose de 25 mg/kg, por via intravenosa e, após entrarem em plano anestésico profundo, foram submetidos à eutanásia com uma ou mais ampolas de 10mL de cloreto de potássio, de acordo com o Decreto nº. 51.838 do Senado Federal, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia.

Os cães foram submetidos ao exame de necropsia pela técnica empregada rotineiramente no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Araçatuba, realizando-se o exame externo do cadáver, evisceração e exame detalhado das alterações macroscópicas presentes nos órgãos, dando-se especial atenção ao coração.

O coração foi dissecado no seu sentido transversal a partir de uma incisão única realizada aproximadamente na altura das cordas tendíneas das válvulas atrioventriculares, obtendo assim o acesso ao endocárdio dos ventrículos direito e esquerdo. Foram coletados três fragmentos de cada uma das seguintes regiões do coração: parede livre de átrio direito (AD), parede livre de ventrículo direito (VD), parede livre de ventrículo esquerdo (VE) e septo interventricular (SIV). Um dos fragmentos foi fixado em formol a 10% tamponado com fosfatos, pH 7,6 por 24 horas, desidratado em soluções de concentrações decrescentes de álcool, diafinizado em xilol e incluído em parafina, para posterior realização das técnicas de histopatologia e imunohistoquímica. Os outros dois foram mantidos em meio de congelamento, imerso em nitrogênio líquido, para posteriormente armazenamento em freezer à temperatura de -80°C.

### 3.3. Exame citológico de linfonodo e medula óssea

O exame citológico dos linfonodos foi realizado dos linfonodos poplíteos e pré-escapulares, por meio da punção aspirativa por agulha fina (PAAF). A colheita de medula óssea foi realizada com agulha hipodérmica 40x16 mm, acoplada à seringa de 20 mL, mediante punção na crista ilíaca, com os animais contidos em decúbito lateral. Os esfregaços do material obtido dos linfonodos e da medula óssea foram realizados imediatamente após a colheita, secos ao ar e corados com corante hematológico rápido, para posterior observação ao microscópio óptico, com objetiva de 100x, em imersão, para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp (Figura 1).

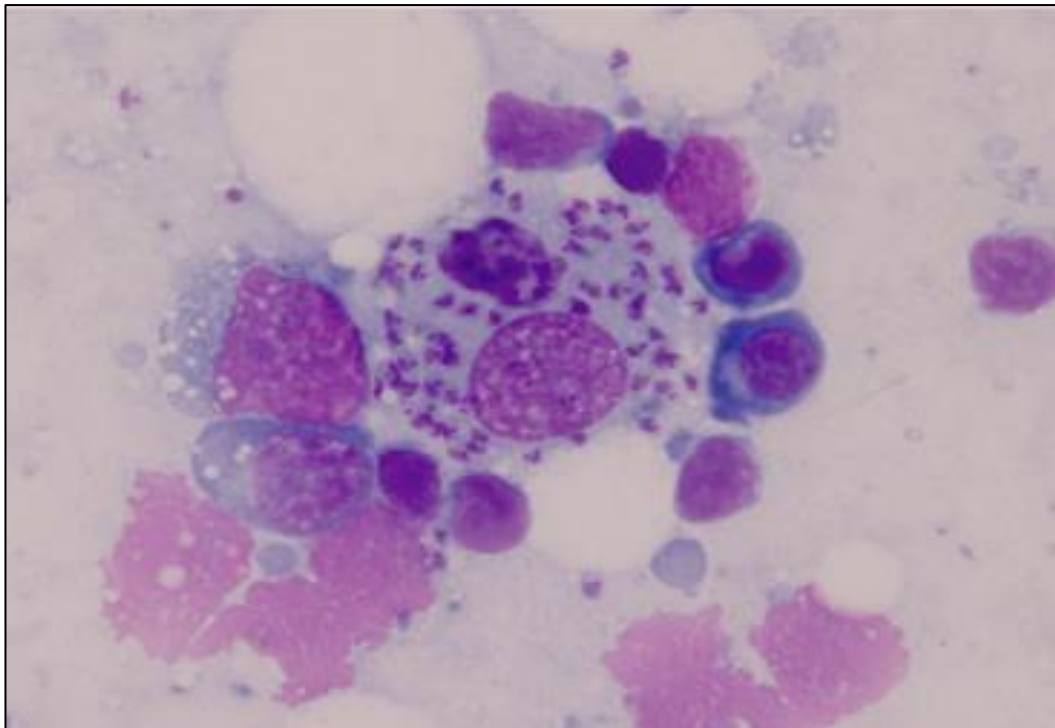


Figura 1. Fotomicrografia de linfonodo poplíteo de um cão com leishmaniose visceral. Observa-se a presença de inúmeras formas amastigotas típicas de *Leishmania* sp. no interior do macrófago e outras formas também fora da célula (Objetiva de 100X). Araçatuba, 2016.

### **3.4. Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* sp.**

As microplacas foram cobertas com antígeno total de *Leishmania infantum chagasi*, cepa MHOM/BR/74/PP75, numa concentração de 20 µg/mL em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6, e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a lavagem com PBS-tween, por três vezes, as placas foram bloqueadas com 200µL de PBS-BSA 1% e incubadas à temperatura ambiente, durante duas horas. Depois de nova lavagem com PBS-tween, por três vezes, 100µL do controle positivo, do controle negativo (animal de área não endêmica saudável) e das amostras de soro, diluídas em PBS contendo 0,05% de tween 20 e 1% de BSA, foram adicionadas a cada poço e incubadas, por três horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas mais quatro lavagens com PBS-tween 20, adicionando-se, em cada poço, 100µL de anticorpo anti-IgG de cão marcado com peroxidase, previamente titulado. Depois de um período de incubação de uma hora, em temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada quatro vezes com PBS-tween 20 e adicionados a cada poço 100µL de uma solução contendo substrato OPD (0,4 mg/ml) em diluente apropriado. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a densidade óptica (D.O.) foi avaliada a 492 nm, utilizando-se leitor de ELISA. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica obtida das amostras em duplicata.

### **3.5. Pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e antígenos de *Dirofilaria immitis***

A presença de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e antígenos de *Dirofilaria immitis* no soro dos animais foi pesquisada pela técnica de ELISA, utilizando-se o kit SNAP® 4DX® test (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.6. Exame histopatológico do músculo cardíaco**

Cortes histológicos de miocárdio de 5mm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM) (BEHMER et al., 1976), e analisados em microscopia óptica com objetivas de 4x, 10x e 40x, em toda a sua extensão. Nos cortes histológicos corados por HE, foram avaliados os aspectos morfológicos do tecido cardíaco, tais como diferenças no tamanho e na forma das fibras, presença de fibras degeneradas e presença de infiltrado inflamatório. Para avaliar a matriz de colágeno os cortes histológicos foram avaliados pela coloração TM, pesquisando-se a presença de fibrose miocárdica. As alterações foram classificadas de acordo com sua intensidade em ausente (-), discreta (+), moderada (++) e acentuada (+++), atribuindo-se a escores variando de 0 a 3 para a realização da análise estatística.

### **3.7. Reação de imuno-histoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD4+, CD8+, CD79+, IgG, óxido nítrico sintetase e MMP-2**

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos dos mesmos fragmentos miocárdicos utilizados para o exame histopatológico. O método empregado foi o da Streptavidina-Biotina-Peroxidase (“Labelled Streptavidina-Biotina-LSAB”). Para a detecção de *Leishmania* sp. foi utilizado soro de cão positivo para leishmaniose visceral, proveniente de Araçatuba – SP, área endêmica para a enfermidade, como fonte de anticorpo primário (1:1000), já os demais anticorpos em suas seguintes diluições estão descritas na figura 2.

<b>Imunomarcacão</b>	<b>Diluição</b>	<b>Descrição</b>	
Linfócitos T CD4+	1:50	AbD Serotec (MCA 1038G)	Monoclonal
Linfócitos T CD8+	1:50	AbD Serotec (MCA 1039G)	Monoclonal
Linfócitos B CD79+	1:200	AbD Serotec (MCA2538GA)	Monoclonal
IgG	1:200	Bethyl Laboratories (A40-123P)	Policlonal
MMP-2	1:100	LifeSpan (LS-B3913)	Policlonal
Óxido Nítrico Sintetase	1:100	Bioss Inc. (MA 01801)	Policlonal

Figura 2. Quadro com os diferentes anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica no miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV.

Os cortes histológicos foram mantidos em estufa a 60°C durante uma hora, posteriormente desparafinizados em xilol e hidratados em soluções com concentrações decrescentes de álcool. Entre cada uma das etapas descritas a seguir os cortes foram submetidos à lavagem com água destilada e solução tampão fosfato (PBS), pH 7,6. A recuperação antigênica foi realizada com solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Para o bloqueio da peroxidase endógena foram realizadas 8 incubações de quatro minutos no peróxido de hidrogênio. Em seguida foi adicionado “Protein Block®” (DakoCytomation, cód. X0909) e os cortes foram incubados por 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, para bloqueio das proteínas inespecíficas. Em seguida foi realizada a incubação com anticorpo primário, por 18 horas a 4°C, em câmara úmida. Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB® DakoCytomation, cód. K0690-1) durante 30 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida. Após nova lavagem com PBS, os cortes foram incubados com o substrato Estreptavidina Peroxidase (Kit LSAB® DakoCytomation, cód. K0690-1) por 30 minutos, à temperatura ambiente, e na sequência foram revelados com o cromógeno diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation, cód. S-3022-2) por três minutos, à temperatura ambiente e em



câmara úmida. Em seguida foram lavados em água destilada e contra-corados com Hematoxilina de Harris, por 2 minutos. Posteriormente, os cortes histológicos foram lavados em água corrente, desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcool e banhados em xilol, para finalmente serem montados com Entellan® (MERCK, cód. HX888585).

Os resultados das imunomarcações foram feitos pela contagem direta do número de células marcadas durante a avaliação microscópica de toda a extensão dos fragmentos avaliados.

### **3.8. Quantificação das citocinas IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ pela técnica de ELISA.**

Para a quantificação das citocinas nos diferentes fragmentos de miocárdio, os tecidos foram previamente pesados e macerados em meio RPMI-1640 (R0883 – Sigma Aldrich – USA), na proporção de 1g de miocárdio para 2 ml de tampão. As amostras foram submetidas a centrifugação a 10.000g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi imediatamente mantido congelado a -80°C até o momento do seu processamento.

A quantificação das citocinas no tecido cardíaco foi realizada utilizando-se kits comerciais DuoSet ELISA para IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (R&D System – Minneapolis – USA). As placas foram sensibilizadas com 100 $\mu$ L de anticorpo de captura (específico para cada citocina) diluído na concentração de uso em PBS e incubado por 18 horas à temperatura ambiente. As placas foram então, lavadas com PBS-Tween por três vezes, seguida da secagem para retirada do excesso. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado utilizando-se uma solução de PBS com 1% de albumina sérica bovina (PBS-BSA) por uma hora à temperatura ambiente, sendo novamente lavadas. Foram adicionadas às placas 100  $\mu$ l das amostras e das curvas padrão e foram incubadas por 2 horas à

temperatura ambiente, sendo novamente lavadas. Foi adicionado 100  $\mu$ l do anticorpo de detecção (específico de cada citocina) diluído em PBS-BSA e foi incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Após nova lavagem da placa, foi então adicionado 100 $\mu$ l de estreptoavidina conjugada com a peroxidase diluída em PBS-BSA e foi incubado por 20 minutos à temperatura ambiente em câmara escura, sendo repetido. Adicionou-se então 100  $\mu$ l de solução de substrato cromogênico, TMB (tetrametilbenzidina), e foi incubado por 20 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi parada utilizando 50 $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico 0,5N e a leitura foi feita utilizando um espectrofotômetro de microplacas (Multiskan EX, Labsystems) em 450 nm.

Foi calculada a média das duplicatas das amostras e da curva e foi subtraído o branco. Foi criada uma curva padrão por regressão linear dos dados utilizando o logaritmo das concentrações e das absorbâncias dos pontos da curva padrão. A partir disso, obtêm-se uma equação, onde a partir da absorbância das amostras é possível calcular a concentração das mesmas.

#### **4. Análise Estatística**

A correlação entre as alterações histopatológicas, imunomarcção do parasito e de linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B CD79+, IgG, INOS e MMP-2 foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. As quantificações de citocinas dos fragmentos foram comparadas em dois grupos, os de animais com infecção (GL), sendo este grupo comparado com o grupo controle (GC), composto por animais que não apresentaram diagnóstico de LV, pelo teste de Mann-Whitney. O grupo de animais infectados foi posteriormente subdividido em dois grupos, sendo um deles formado por fragmentos com presença de imunomarcção do parasito (GP) e outro grupo que não apresentou imunomarcção do parasito no tecido miocárdio (GSP), com o grupo controle. Para isso foi utilizado o ANOVA, seguido do pós-teste de

Dunn para comparação entre os três diferentes grupos. Diferença significativa foi considerada quando os valores de “p” foram inferiores a 0,05.

## 5. Resultados

Para a composição do grupo experimental foram avaliados um total de 100 animais, entretanto 80% apresentaram detecção de anticorpos anti-*E. canis* pelo teste rápido, sendo assim excluídos do presente estudo. Os 20 animais que foram inseridos no presente estudo apresentaram títulos de anticorpos anti-*Leishmania* sp. com valores acima do ponto de corte (0,193), com média de  $0,697 \pm 0,283$ , enquanto a do grupo controle foi de  $0,135 \pm 0,02$  (Figura 2).

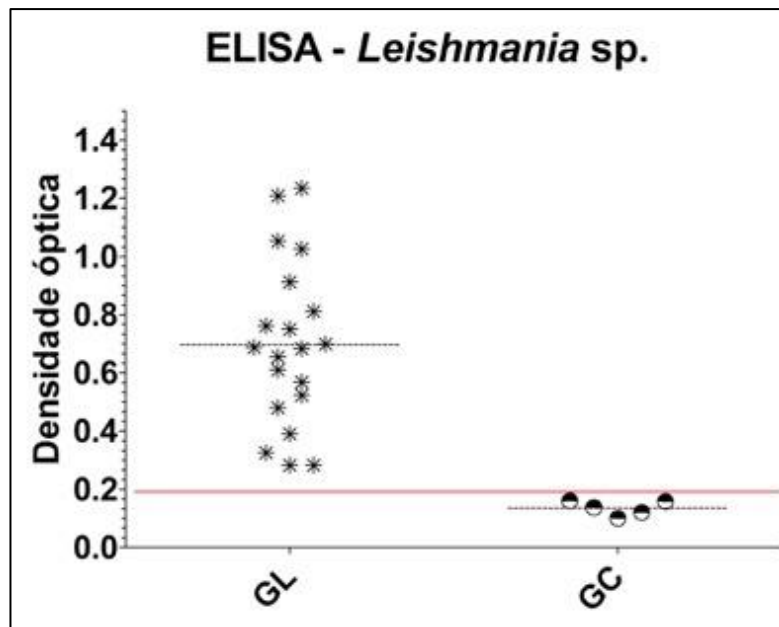


Figura 3. Gráfico de dispersão dos valores de D.O. obtidos pela técnica de ELISA para *Leishmania* sp. A linha vermelha indica o ponto de corte da reação (0,193), sendo os pontos contidos acima da linha, dos animais com sorologia considerada reagente para doença (GL). Já os valores abaixo indicam a D.O. dos animais inseridos no grupo controle (GC), que apresentaram os demais exames para doença também considerados negativos.

Todos os animais inseridos no presente estudo foram considerados sintomáticos, entretanto, no exame físico do sistema cardiovascular os mesmos não apresentaram qualquer alteração sugestiva de doença cardíaca, como ocorrência de sopro, arritmias e alteração no pulso arterial. Entre os sinais clínicos mais observados nesses cães podem-se descrever as lesões dermatológicas, oftálmicas, linfadenomegalia, emagrecimento, palidez de mucosas e atrofia muscular (Figura 3), sendo a incidência das principais alterações clínicas, relacionadas na figura 4.



Figura 4 – Sinais clínicos observados em cães naturalmente acometidos por LV durante a realização da coleta dos materiais para o desenvolvimento do projeto de pesquisa. A – Onicogribose; B – hiperqueratose de espelho nasal; C – descamação em pavilhão auricular; D – lesões ulcerativas palpebrais. Araçatuba, 2016.

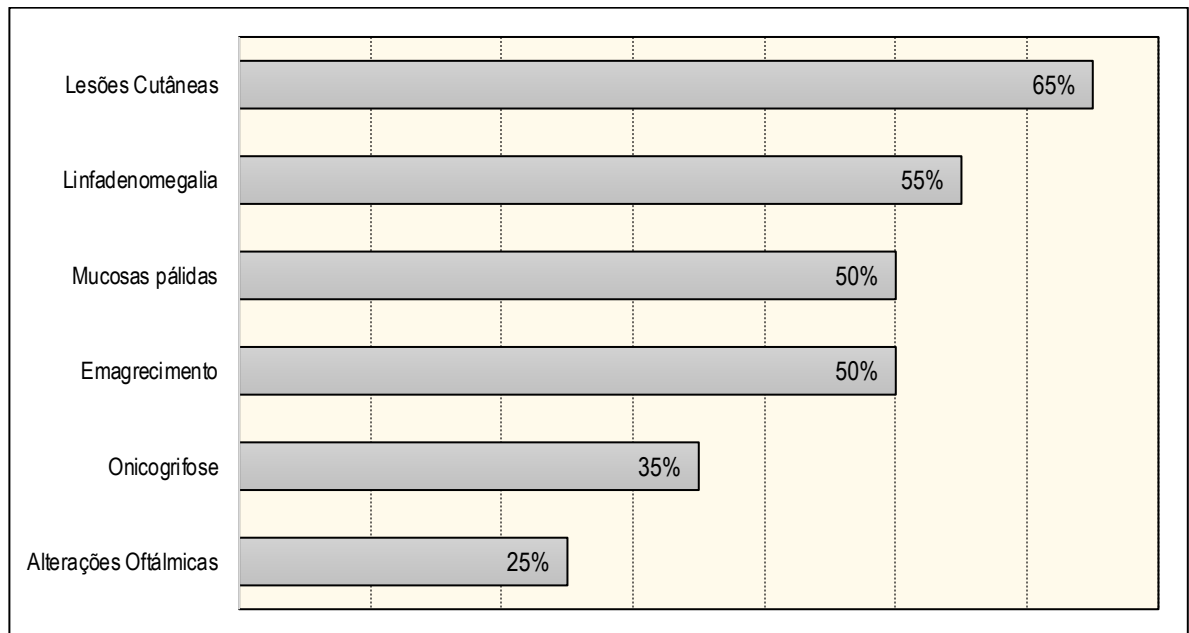


Figura 5. Ocorrência dos diferentes sinais clínicos observados nos cães avaliados durante o desenvolvimento do presente estudo, para a avaliação das alterações no miocárdio de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. Araçatuba, 2016.

A predominância sexual foi de machos, com um percentual de 60% (12/20). A idade dos animais variou de 1 a 7 anos, com média de 3 anos. No que diz respeito à raça, os animais sem raça definida foram predominantes, correspondendo a 90% (18/20) dos animais avaliados.

### 5.1 Alterações histopatológicas no miocárdio

Foram avaliados quatro fragmentos (AD, VD, SIV e VE) do miocárdio de cada animal, totalizando 80 cortes histológicos. Alterações histopatológicas foram observadas no miocárdio de 75% (15/20) dos animais avaliados que compuseram o grupo experimental. No grupo controle não foi identificada alteração histopatológica em nenhum fragmento avaliado. O número absoluto de alterações observadas em cada região e as respectivas percentagens encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Intensidade de infiltrado inflamatório na parede livre de átrio direito (AD), parede livre de ventrículo direito (VD), septo interventricular (SIV) e parede livre de ventrículo esquerdo (VE) do miocárdio de 20 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. Número absoluto e porcentagem de fragmentos avaliados. (Araçatuba-SP, 2016)

Classificação	AD		VD		VE		SIV		% Total
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Ausente	5	25	8	40	9	45	10	50	40
Discreto	9	45	5	25	6	30	5	25	31,25
Moderado	3	15	5	25	5	25	5	25	22,5
Intenso	3	15	2	10	0	0	0	0	6,25

Em 60% (48/80) do total de fragmentos avaliados observou-se a presença de infiltrado inflamatório no miocárdio. Das regiões miocárdicas que apresentaram alteração, o AD foi a região que apresentou maior incidência de inflamação, observada em 75% (15/20) dos animais, seguida do VD, VE e SIV com 60% (12/20), 55% (11/20) e 50% (10/20) respectivamente. Em relação à intensidade, todas as quatro regiões avaliadas apresentaram um infiltrado considerado de discreto a moderado, entretanto somente o AD e o VD apresentaram um infiltrado considerado acentuado em um total de 5 fragmentos, o que correspondeu a 20% (4/20) dos animais avaliados, entretanto nenhum desses pacientes apresentou sinais clínicos

de doença cardíaca. Apesar de o lado direito apresentar maior incidência de lesões miocárdicas, não houve diferença significativa quando se comparou as quatro diferentes regiões do coração ( $p=0,4734$ ). Os infiltrados inflamatórios eram, em sua maior parte, do tipo linfoplasmocitário, algumas vezes também associado à presença de macrófagos (Figura 5). A presença de fibrose das fibras do miocárdio também foi evidenciada na coloração de TM, porém com uma incidência muito inferior, sendo observada em somente 10% (2/20) dos animais avaliados.

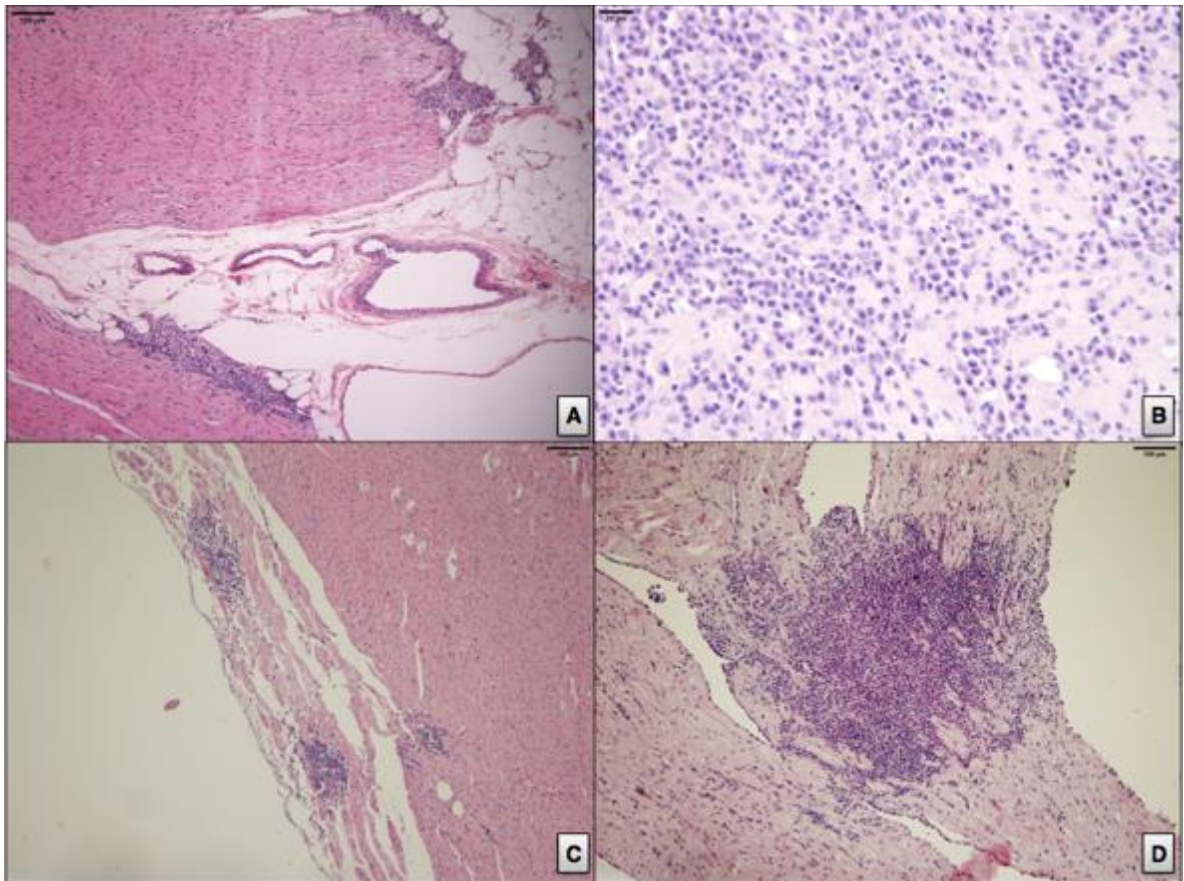


Figura 6. Fotomicrografia do miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, coloração de HE. (A) Região de átrio direito de cão apresentando infiltrado inflamatório mononuclear moderado, objetiva de 10X. (B) Miocárdio com infiltrado inflamatório mononuclear. Região de ventrículo direito com infiltrado inflamatório mononuclear discreto (C). (D) Região de átrio direito com infiltrado inflamatório mononuclear acentuado.

## 5.2. Imunomarcação de *Leishmania* sp.

A imunomarcação do parasito (Figura 7) ocorreu em 60% (12/20) dos animais avaliados. Considerando-se todos os fragmentos, foi possível detectar imunomarcação de *Leishmania* sp. em 33,75% (27/80) do total de fragmentos avaliados, sendo sua presença em pelo menos um fragmento, de cada região avaliada. Não foi observada correlação entre o número de parasitos marcados e a intensidade do infiltrado inflamatório ( $p=0,0682$ ), entretanto não foi possível determinar a presença do parasito onde não houvesse a presença do infiltrado inflamatório. A ocorrência do parasito foi mais evidente no lado direito do coração, tanto no AD como no VD, sendo observada em 40% (8/20) do total de amostras destes dois fragmentos, seguido do VE e SIV, com 30% (6/20) e 25% (5/20) de presença de imunomarcação, respectivamente. Nos 20 fragmentos de miocárdio que não apresentaram nenhum tipo de alteração histopatológica também não foram identificados parasitos. Apesar da presença do parasito ter sido identificada em mais fragmentos do lado direito, diferença significativa não foi detectada quando os quatro fragmentos foram comparados entre si ( $p=0,5425$ ).



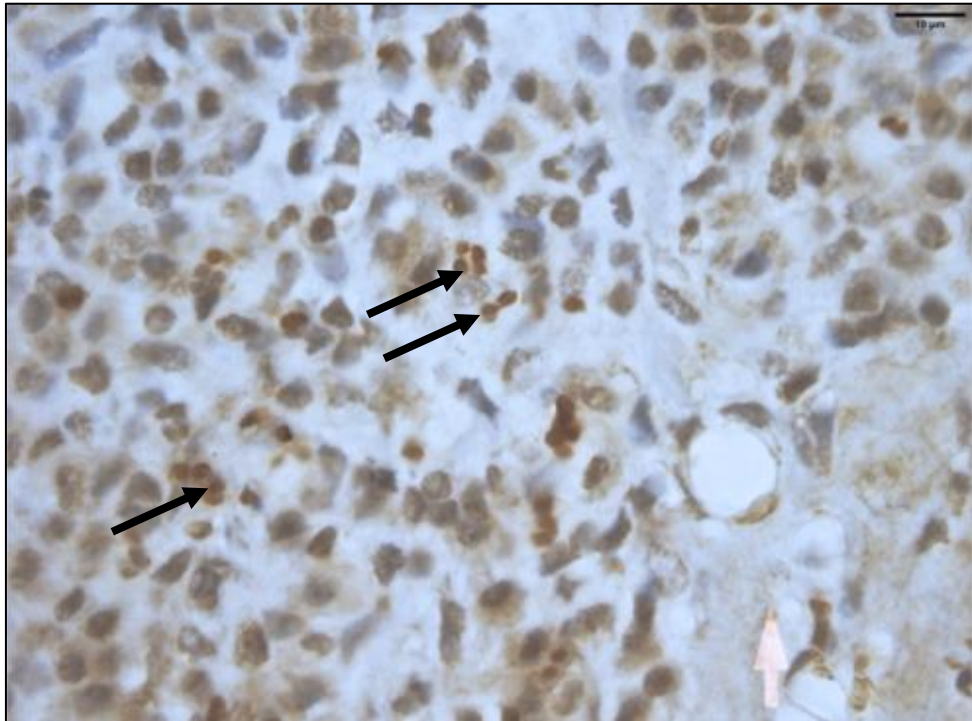


Figura 7. Fotomicrografia da imunomarcção de *Leishmania* sp. no AD de um cão naturalmente acometidos por LV (Objetiva de 100X). As setas indicam a presença da imunomarcção do parasito no tecido avaliado (Araçatuba, 2016).

### **5.3. Imunomarcção de Linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B CD79+, IgG, INOS e MMP-2**

A imunomarcção de linfócitos T CD4+ (Figura 8) ocorreu em 50% (10/20) dos animais infectados, o que correspondeu a 33,75% (27/80) do total de fragmentos avaliados. A imunomarcção da subpopulação de linfócitos T CD4+ foi maior no VD, com 45% (9/20) dos fragmentos imunomarcados, enquanto nos demais fragmentos foi observado a presença dessa subpopulação de linfócitos em 30% (6/20) de cada uma das regiões avaliadas; entretanto, não houve diferença quando se comparou a presença de linfócitos T CD4+ entre as quatro regiões ( $p=0,8929$ ). A imunomarcção dessa subpopulação de linfócitos apresentou correlação positiva com a intensidade do infiltrado inflamatório ( $p=0,0160$ ), assim como apresentou correlação com a imunomarcção do parasito no tecido ( $p<0,0001$ ). Nenhum fragmento do grupo controle apresentou imunomarcção de linfócito T CD4+ nas regiões avaliadas.

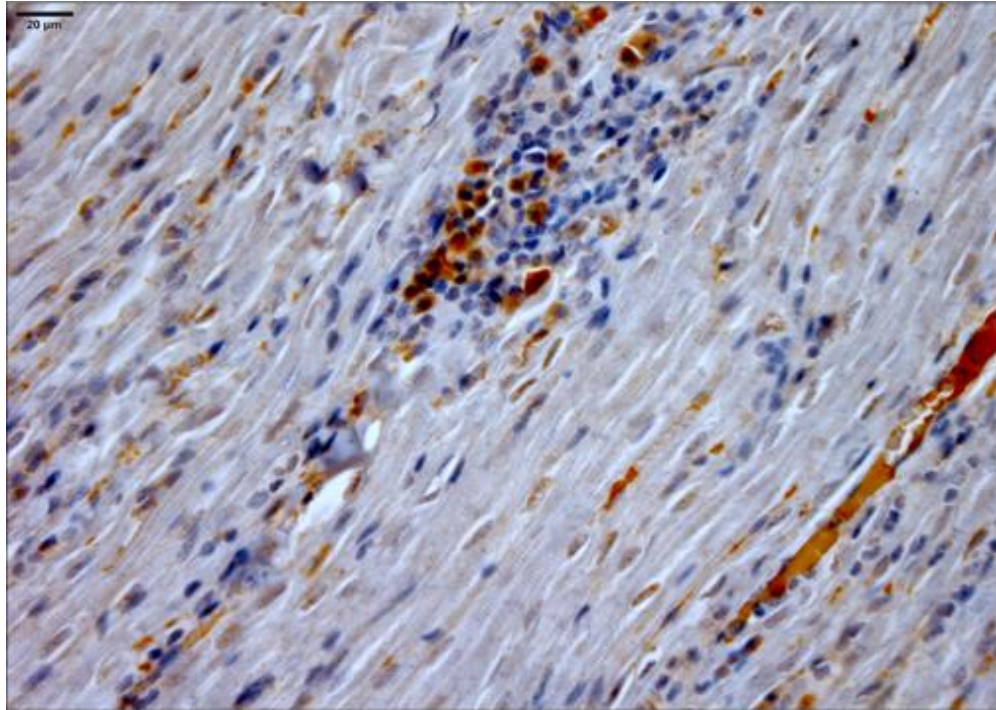


Figura 8. Fotomicrografia da imunomarcagem de linfócitos T CD4+ no VD de um cão naturalmente acometidos por LV (Objetiva de 40X; Araçatuba, 2016).

A presença de linfócitos T CD8+ (Figura 9) foi evidenciada em 70% (14/20) dos animais e estando presente nos quatro fragmentos avaliados em 38,75% (31/80) do total das amostras. O VD foi a região com mais fragmentos imunomarcados, com 55% (11/20) das amostras com presença dessa subpopulação de linfócitos, seguida do VE, SIV e AD, com 50% (10/20), 30% (6/20) e 20% (4/20), respectivamente. Apesar de o número de regiões marcadas não ser o mesmo, a quantidade de células marcadas nas diferentes regiões avaliadas não apresentou diferença significativa ( $p=0,1525$ ). Correlação positiva foi detectada entre a detecção de linfócitos T CD8+ com a intensidade do infiltrado inflamatório ( $p=0,0161$ ) e com a imunomarcagem do parasito do tecido miocárdio ( $p=0,0002$ ). Os fragmentos do grupo controle não apresentaram imunomarcagem para linfócitos T CD8+.

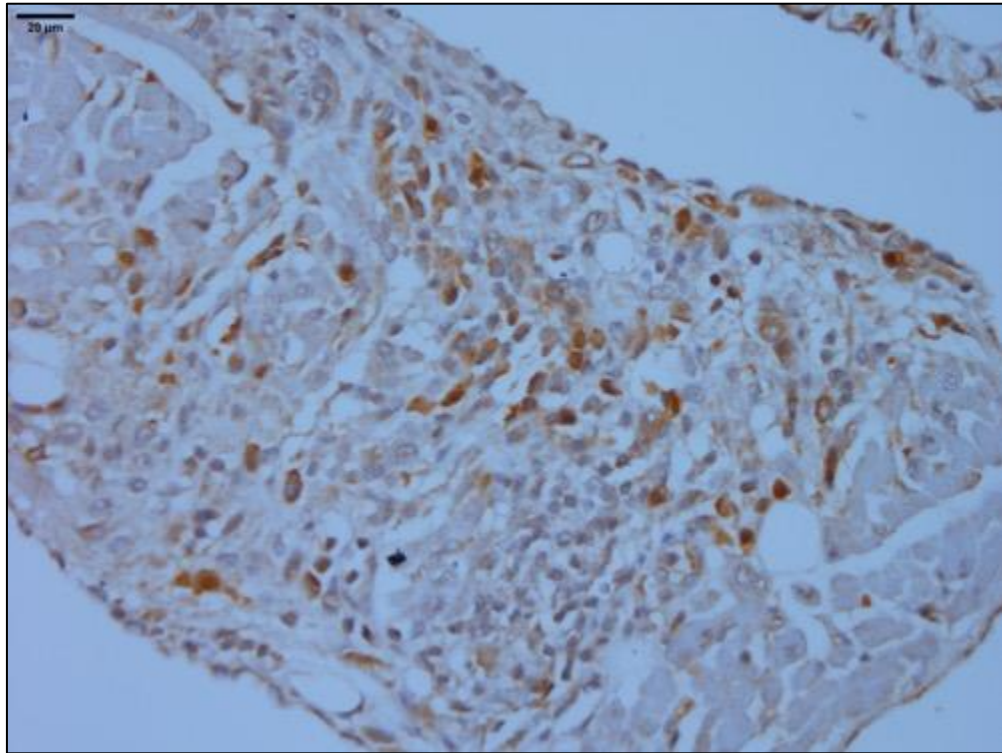


Figura 9. Fotomicrografia da imunomarcação de linfócitos T CD8+ no AD de um cão naturalmente acometidos por LV (Objetiva de 40X; Araçatuba, 2016).

Do total de fragmentos avaliados, a ocorrência de imunomarcação para linfócitos B CD79+ (Figura 10) foi inferior às subpopulações de linfócitos T, sendo observada em 25% (5/20) dos animais avaliados e 11,25% (9/80) do total de fragmentos, enquanto a presenç a de imunomarcação das diferentes subpopulações de linfócitos T foi de aproximadamente 35%. Apesar de menos expressiva, a detecção foi possível em todas as quatro regiões, sendo que o SIV apresentou 25% (5/20), o AD 10% (2/20), e o VD e VE apresentaram 5% (1/20) de fragmentos imunomarcados cada, porém diferenç a significativa entre a detecção de linfócitos B CD79+ entre as diferentes regiões, não foi observada ( $p=0,1663$ ). A presenç a de linfócitos B foi positivamente correlacionada com a intensidade do processo inflamatório ( $p=0,030$ ) e com a presenç a do parasito ( $p=0,0466$ ), assim como não foi possível observar linfócitos B nos fragmentos dos animais do grupo controle.

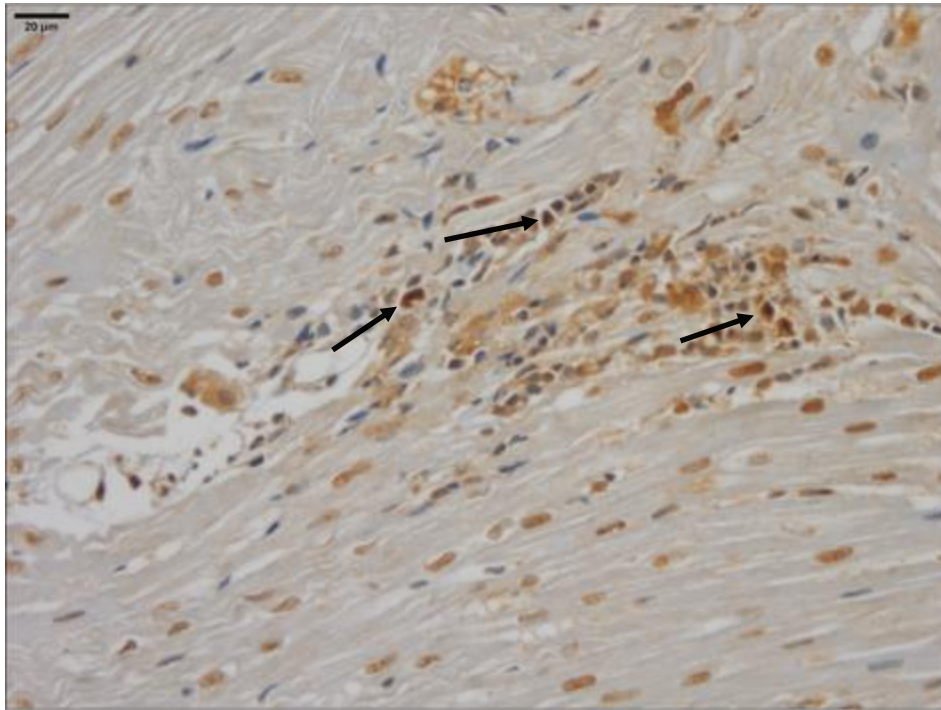


Figura 10. Imunomarcção de Linfócitos B CD79+ no infiltrado inflamatório (discreto) do miocárdio de cão naturalmente acometido por LV. Objetiva de 40X. Araçatuba, 2016. As setas indicam as células imunomarcadas.

A imunomarcção para IgG (Figura 11) foi observada em 40% (8/20) dos animais, resultando em um total de 18,75% (15/80) dos fragmentos avaliados. Das áreas avaliadas, o AD foi a região que mais apresentou imunomarcção para a imunoglobulina, com 25% (5/20) de amostras apresentando detecção de IgG no tecido. O VD e o SIV tiveram presença de imunomarcção em 20% (4/20) dos fragmentos, em cada um deles, enquanto o VE apresentou imunomarcção em somente dois fragmentos (10%). A avaliação entre o número de células marcadas para IgG não resultou em diferença significativa entre os quatro fragmentos avaliados ( $p=0,4576$ ). A intensidade do infiltrado inflamatório não apresentou correlação com a detecção de IgG ( $p=0,3126$ ), porém a presença do parasito apresentou correlação positiva com a imunomarcção de IgG no tecido ( $p=0,04$ ).

Houve correlação positiva entre a imunomarcção de IgG e linfócitos B CD79+ nos fragmentos avaliados ( $p=0,022$ ).

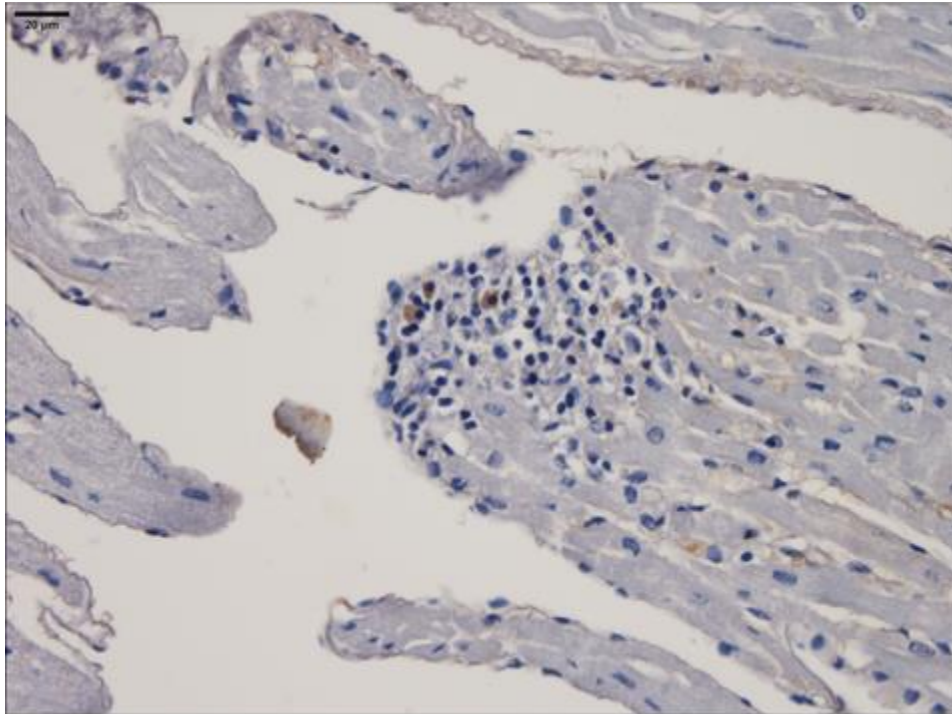


Figura 11. Imunomarcção de IgG no infiltrado inflamatório (discreto) do miocárdio de cão naturalmente acometido por LV (Objetiva de 40X; Araçatuba, 2016).

A imunomarcção de óxido nítrico sintetase (Figura 12) foi observada em 20% (4/20) dos animais e em 7,5% (6/80) do total de fragmentos avaliados. No AD, 15% (3/20) dos fragmentos apresentaram marcação para INOS, já nas outras três regiões avaliadas (VD, VE e SIV), somente em um fragmento (5%) de cada região foi possível detectar INOS no miocárdio, entretanto não houve diferença significativa quando se comparou a imunomarcção de INOS entre as diferentes regiões ( $p=0,5926$ ). Da mesma forma, não foi observado correlação entre a imunomarcção de INOS com a intensidade do infiltrado inflamatório ( $p=0,1057$ ) ou com a presença do parasito ( $p=0,0515$ ) nos fragmentos avaliados.

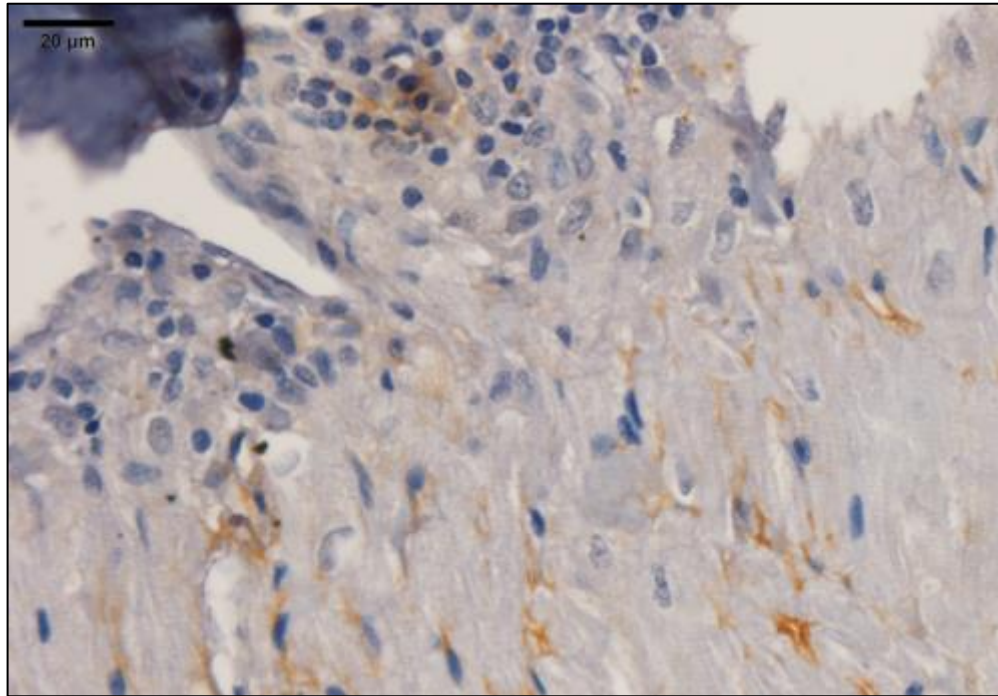


Figura 12. Imunomarcção de iNOS no infiltrado inflamatório (discreto) no miocárdio de cão naturalmente acometidos por LV (Objetiva de 40X; Araçatuba, 2016).

A MMP-2 (Figura 13) foi detectada em 35% (7/20) dos animais avaliados, sendo observada em 12,5% (10/80) do total de fragmentos, sendo o VD a região com maior incidência de imunomarcção, apesar de não ter sido evidenciado diferença significativa entre as diferentes regiões ( $p=0,4753$ ). Quando se avaliou individualmente cada região o VD apresentou marcação em 20% (4/20) dos fragmentos, seguido do AD, com 15% (3/20), do SIV e do VE, com 10% (2/20) e 5% (1/20) em cada uma das regiões. Apesar de ter sido observado correlação positiva entre a imunomarcção de MMP-2 com a intensidade do infiltrado inflamatório ( $p=0,0026$ ), a presença do parasito não foi correlacionada com a imunomarcção da MMP-2 ( $p=0,1045$ ).

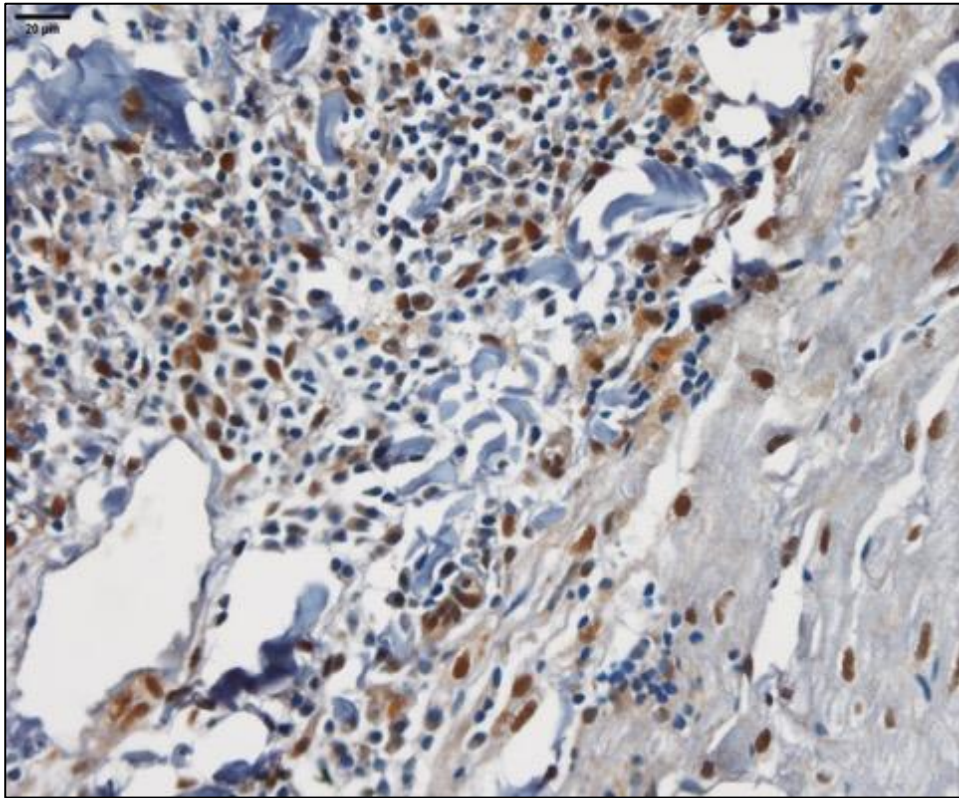


Figura 13. Fotomicrografia da imunomarcção de MMP-2 no miocárdio de cão naturalmente acometido por LV (Objetiva de 40X; Araçatuba, 2016).



#### **5.4. Quantificação de citocinas IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ pela técnica de ELISA**

A quantificação de IL-4 apresentou diferença significativa quando se comparou todos os fragmentos, sem considerar as diferentes regiões do miocárdio, dos animais infectados com os animais do grupo controle ( $p=0,030$ ; Figura 14), sendo que esta citocina foi liberada em quantidades menores nos fragmentos dos animais infectados. Quando os fragmentos dos animais infectados, foram subdivididos entre a presença (GP) e ausência do parasito (GSP) no miocárdio, quando comparados com o grupo controle (GC), diferença significativa foi detectada somente entre os fragmentos com parasito e o grupo controle ( $p<0,05$ ), porém não houve diferença significativa, quando se comparou os dois grupos de animais infectados entre si, em relação a quantidade de IL-4 produzida ( $p>0,05$ ). Quando as quatro regiões no miocárdio foram avaliadas separadamente (AD, VD, VE e SIV), não foi possível detectar diferença significativa em nenhum fragmento.

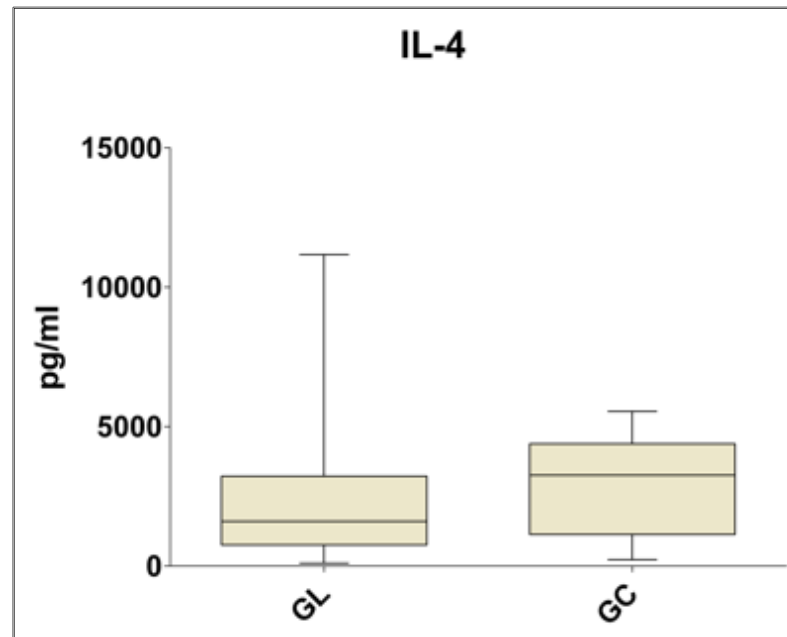


Figura 14. Boxsplot das quantificações de IL-4 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV. Diferença estatística significativa foi evidenciada somente entre os grupos GP e GC ( $p < 0,05$ ). Entretanto, quando se comparou os demais grupos entre si, diferença significativa não foi detectada ( $p > 0,05$ ).

A quantificação de IL-7 não apresentou diferença significativa, quando se comparou todos os fragmentos entre os animais infectados e os animais que compuseram o grupo controle ( $p>0,05$ ; Figura 15). Da mesma forma, não houve diferença significativa quando estes fragmentos dos animais infectados foram subdivididos em relação a presença e a ausência do parasito nos fragmentos, com o grupo controle ( $p>0,05$ ). Entretanto, quando as diferentes regiões foram avaliadas separadamente, somente o AD apresentou diferença entre os animais do grupo controle com os animais infectados, sendo que nos animais infectados foi possível identificar uma diminuição da produção desta citocina, quando comparado ao controle ( $p=0,005$ ; Figura 15).

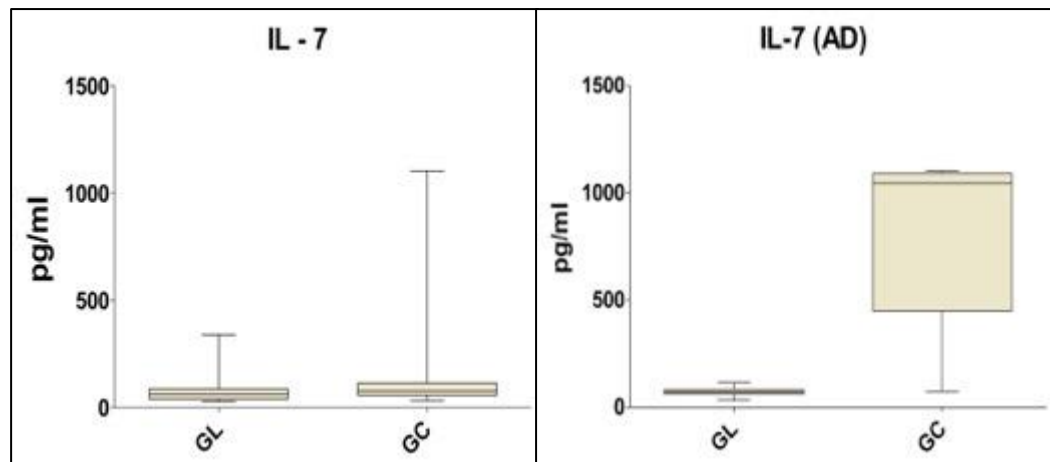


Figura 15. (A) Boxsplot das quantificações de IL-7 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, comparando-se os fragmentos dos animais infectados com o grupo controle, sem diferença significativa ( $p>0,05$ ). (B) Comparação dos fragmentos de cães com LV, comparado ao grupo controle, somente na região do AD, que apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p<0,05$ ), porém a produção foi inferior nos animais infectados (GL) quando comparado a controle.

A quantificação de IL-10 não apresentou diferença significativa quando se comparou todos os fragmentos, entre os animais infectados e os animais do grupo controle ( $p=0,1606$ ; Figura 16), e também não foi observado diferença significativa quando estes foram subdivididos em fragmentos com (GP) e sem parasito no miocárdio (GSP), também comparados ao grupo controle ( $p=0,07$ ).

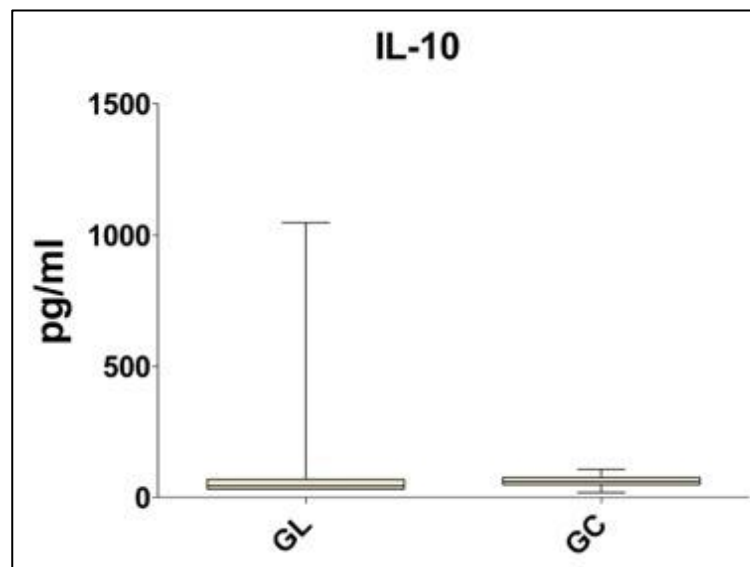


Figura 16. Boxsplot das quantificações de IL-10 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, comparando-se os fragmentos dos animais infectados com o grupo controle, sem diferença significativa ( $p>0,05$ ).

A quantificação de IL-12 apresentou diferença significativa quando os fragmentos dos animais infectados foram comparados ao grupo controle ( $p=0,002$ ). Já quando os fragmentos dos animais infectados foram subdivididos em fragmentos com (GP) e sem parasito (GSP) no tecido, e comparados ao grupo controle, diferença significativa foi observada somente entre os fragmentos não parasitados (GSP) com o grupo controle ( $p<0,05$ ; Figura 17), sendo que os fragmentos não parasitados apresentaram quantidades da citocina inferiores, em relação aos animais não infectados. Entretanto, quando se comparou a produção de IL-12 nas diferentes regiões do coração, separadamente, diferença significativa não foi observada ( $p>0,05$ ).

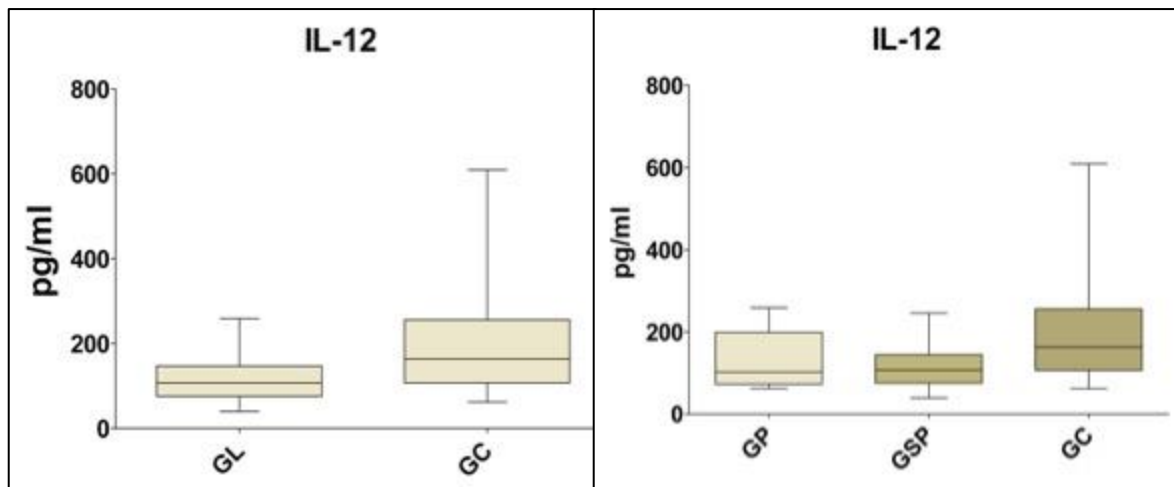


Figura 17. (A) Boxsplot das quantificações de IL-12 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, comparando-se os fragmentos dos animais infectados com o grupo controle, com diferença significativa ( $p=0,002$ ). (B) Boxsplot das quantificações de IL-12 dos animais infectados com parasito (GP) e sem parasito no miocárdio (GSP) em relação ao grupo controle, com diferença significativa somente entre os animais infectados sem parasito e o grupo controle ( $p<0,05$ ).

A quantificação de IL-15 não apresentou diferença significativa quando se comparou todos os fragmentos dos animais infectados e os animais do grupo controle ( $p=0,8690$ ; Figura 18), quando estes fragmentos foram subdivididos com e sem parasito no miocárdio ( $p=0,6519$ ), assim como não apresentou diferença quando os fragmentos foram comparados entre as diferentes regiões do miocárdio com o grupo controle ( $p>0,05$ ).

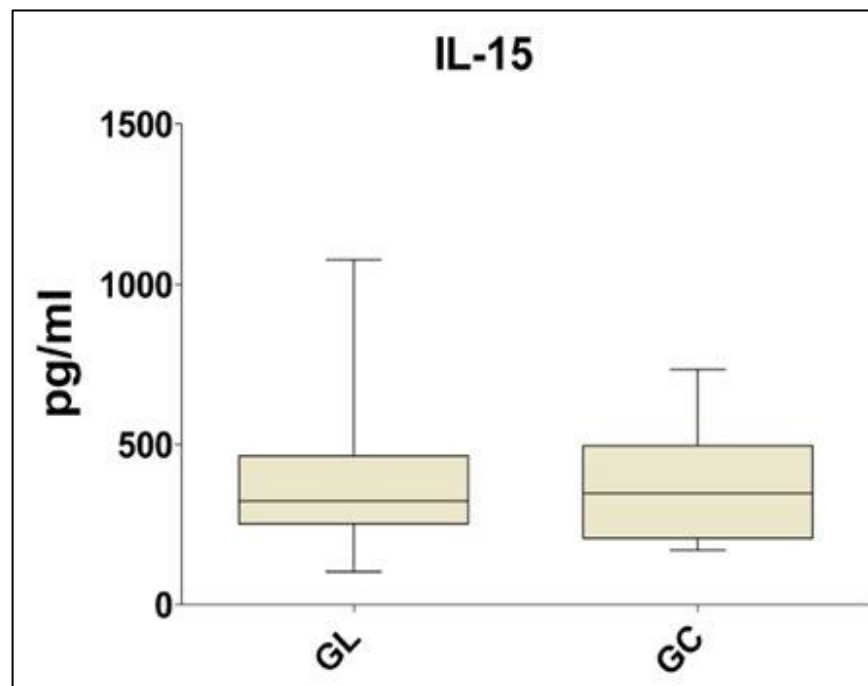


Figura 18. Boxsplot das quantificações de IL-15 nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV comparados ao grupo controle, não sendo observado diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).

A quantificação de IFN- $\gamma$  foi inferior nos fragmentos dos animais infectados quando comparados aos fragmentos dos animais do grupo controle, apresentando diferença significativa ( $p < 0,0001$ ; Figura 19). Além disso, quando os fragmentos foram subdivididos em fragmentos parasitados (GP) e não parasitados (GSP), não houve diferença entre os dois grupos de animais infectados ( $p > 0,05$ ), porém estes dois grupos diferiram significativamente, do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Quando estes fragmentos foram avaliados de acordo com as diferentes regiões do miocárdio, em relação ao grupo controle, a produção de IFN- $\gamma$  foi superior, com significância estatística, no AD, VE e SIV nos fragmentos do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

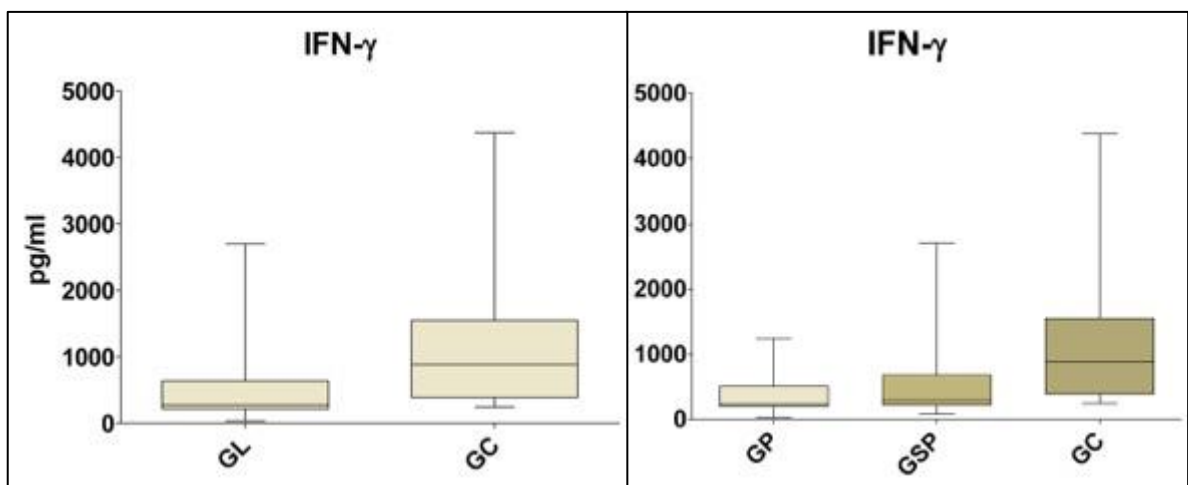


Figura 19. (A) Boxplot das quantificações de IFN- $\gamma$  nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV, comparando-se os fragmentos dos animais infectados com o grupo controle, com diferença significativa ( $p=0,002$ ). (B) Boxplot das quantificações de IFN- $\gamma$  dos animais infectados com parasito (GP) e sem parasito no miocárdio (GSP) em relação ao grupo controle, com diferença significativa somente entre os animais infectados sem parasito e o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

A quantificação de TNF- $\alpha$  não apresentou diferença significativa quando se

comparou todos os fragmentos dos animais infectados, com os animais do grupo controle ( $p=0,2560$ ; Figura 20), assim como não foi possível detectar diferença na produção de  $\text{TNF-}\alpha$  entre os fragmentos parasitados e não parasitados, com o grupo controle ( $p>0,05$ ) e também entre as diferentes regiões do coração avaliadas separadamente ( $p>0,05$ ).

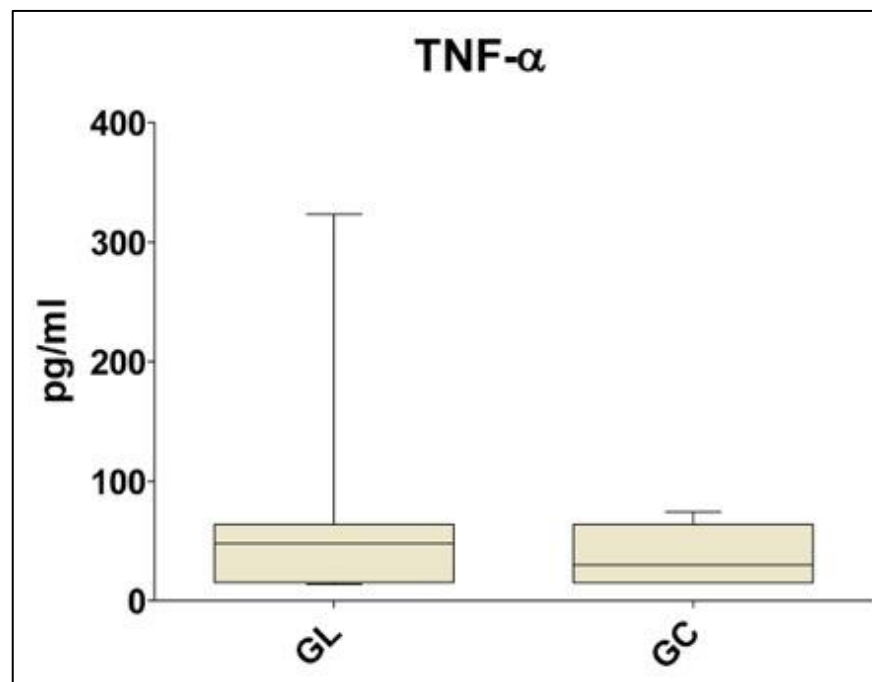


Figura 20. Boxsplot das quantificações de  $\text{TNF-}\alpha$  nos fragmentos de miocárdio de cães naturalmente acometidos por LV comparados ao grupo controle, não sendo observado diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).



## 6. Discussão

Uma vez que é descrita a ocorrência de alterações miocárdicas em cães infectados por *E. canis* (DINIZ et al., 2009), a necessidade de exclusão de infecção em cães se faz necessária. A infecção por *E. canis* em cães é considerada endêmica no estado de São Paulo (SANTOS et al., 2009), sendo um importante diagnóstico diferencial nos animais que compuseram o grupo experimental, uma vez que o objetivo do trabalho foi avaliar a presença de alterações histopatológicas nos animais com LV, e a miocardite causada por outro agente poderia influenciar negativamente nos resultados encontrados. A incidência de infecção por *E. canis* foi de aproximadamente 80%, sendo superior a estudos que avaliaram a presença de infecção em cães de outras regiões, também consideradas endêmicas (BULLA et al., 2004; SANTOS et al., 2009), ratificando dessa forma a necessidade de exames que excluam a infecção nesses cães.

Apesar dos sinais clínicos sugestivos de LV terem sido observados na totalidade dos animais avaliados, em nenhum dos cães do presente estudo foram observados sinais clínicos de alterações cardíacas. A ausência de sinais clínicos relacionados ao sistema cardiovascular em cães com LV é um achado comum (ALVES et al., 2010; ROSA et al., 2014; COSTAGLIOLI et al., 2016), apesar da existência de relatos de cães com leishmaniose visceral acompanhados de alterações cardíacas (TORRENT et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2015).

A presença de miocardite no presente estudo foi evidenciada em 75% (15/20) dos cães avaliados, em pelo menos uma das regiões, valores semelhantes aos observados por outros autores (ALVES et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2015). Entretanto, a incidência de miocardite nos cães por nós avaliados, divergiu das observações de outros dois estudos recentes (ROSA et al., 2014; COSTAGLIOLI et al., 2016), que identificaram a presença de infiltrado inflamatório no miocárdio de todos os cães com leishmaniose visceral. De todas as alterações histopatológicas

observadas, o infiltrado inflamatório foi a mais frequente (LÓPEZ-PEÑA et al., 2009; SILVA et al., 2009; ALVES et al., 2010; ROSA et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2015; COSTAGLIOLI et al., 2016). O infiltrado inflamatório foi considerado, em sua grande maioria, de ocorrência discreta a moderada, confirmando as observações de estudos anteriores (ALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2010; ROSA et al., 2014; COSTAGLIOLI et al., 2016), apesar de no presente estudo ter sido identificada a ocorrência de um infiltrado considerado acentuado em quatro animais, nenhum desses cães apresentou sinais clínicos compatíveis com doença cardíaca. Torrent et al. (2005) relataram a presença de sinais como dispneia e morte por parada cardiorrespiratória em um cão com LV com miocardite acentuada, entretanto estes sinais não foram por nós observados, assim como não foi rotineiramente descrito, como sendo uma importante causa de alterações clínicas nesses cães que tiveram acometimento cardíaco (ALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2010; ROSA et al., 2014; COSTAGLIOLI et al., 2016).

Da mesma forma que foi descrito no presente estudo, o maior acometimento do lado direito do coração já havia sido descrito (ROSA et al., 2014). Já Costaglioli et al. (2016) determinaram a presença de alterações no miocárdio de cães com LV, avaliados da mesma forma, em quatro regiões distintas, entretanto não discriminaram qual delas foi mais acometida (COSTAGLIOLI et al., 2016). Não foi possível determinar a causa de uma maior incidência de inflamação no lado direito do coração, principalmente no AD. Levando-se em consideração que altas cargas parasitárias podem ser encontradas em órgãos como baço e fígado de cães sintomáticos (REIS et al., 2006; REIS et al., 2009; RODRIGUÉZ-CORTES et al., 2016), uma possível explicação seria o fato de que o retorno venoso destes órgãos se faz diretamente ao átrio direito, facilitando a penetração do parasita nesta porção do miocárdio.

A presença de fibrose foi evidenciada no miocárdio de 10% (2/20) dos

animais avaliados. Degeneração do miocárdio, assim como necrose de cardiomiócitos, não foram evidenciados no presente estudo, divergindo dos achados de outros estudos trabalhos pretéritos (ROSA et al., 2014; COSTAGLIOLI et al., 2016) que observaram a formação de granulomas, necrose de cardiomiócitos e degeneração das fibras miocárdicas nos fragmentos avaliados (ROSA et al., 2014). Alves e colaboradores (2010) referem a presença de degeneração no miocárdio de cães, entretanto a formação de granulomas também não fora descrita pelos autores.

A incidência de imunomarcção no miocárdio foi inferior à observada por Rosa e colaboradores (2014), que tiveram 66,7% (n=120) dos fragmentos com presença de *Leishmania* sp. no tecido, e superior à observada por Dos Santos e colaboradores (2015) e Alves e colaboradores (2010), que encontraram somente um animal com o parasito no miocárdio, em cada um dos estudos, em 36 e seis cães avaliados, respectivamente. Já em um trabalho recentemente publicado em cães com miocardite, nenhum parasito foi observado nos fragmentos avaliados, mesmo na presença de 100% de alterações no miocárdio (COSTAGLIOLI et al., 2016). E quando presentes, os parasitos foram sempre observados nos infiltrados inflamatórios, não sendo encontrados livres entre as fibras musculares, corroborando os achados de estudos prévios (ROSA et al., 2014). A participação direta do parasito na ocorrência de miocardite continua sendo uma dúvida nos cães com LV. Enquanto Rosa e colaboradores (2014), encontraram correlação entre a presença do parasito e a resposta inflamatória local, a ausência de parasito no estudo realizado por Costaglioli et al. (2016) e a descrição de alterações histopatológicas na ausência de *Leishmania* sp., sugerem que as alterações podem ser também causadas pela resposta inflamatória desencadeada durante o desenvolvimento da doença, principalmente pela deposição de imunocomplexos, comum na LV (ALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2010; COSTAGLIOLI et al., 2016). A média da carga parasitária no miocárdio da população avaliada foi

semelhante à descrita por Rosa e colaboradores (2014), sendo considerada baixa pelos autores. O baixo número de parasitos, observados no presente estudo e em trabalhos prévios (ALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2010; ROSA et al., 2014), assim como sua ausência (COSTAGLIOLI et al., 2016), confirmam que o tecido miocárdico não é um local de comum localização do mesmo.

Costaglioli e colaboradores (2016) observaram uma predominância de linfócitos TCD8+ em comparação a presença de linfócitos TCD4+ no miocárdio de cães acometidos pela doença, com 100% (15/15) dos animais apresentando linfócitos TCD8+, comparado a observação de TCD4+ em 80% (12/15) dos animais avaliados. Paciello et al. (2009), avaliando a presença de infiltrado inflamatório no tecido muscular de cães com LV, verificaram que a subpopulação de CD8+ também foi mais presente, quando comparada à CD4+. Estes resultados divergem dos encontrados no presente estudo, onde não foi detectada diferença significativa entre o número de células marcadas entre as subpopulações de linfócitos T, apesar da diferença entre o número de animais com detecção das diferentes subpopulações de linfócitos ter sido identificada. A redução de linfócitos T CD8+ no sangue periférico de animais com LV tem sido observado em cães infectados, principalmente nos cães sintomáticos (LEAL et al., 2014). Por outro lado, um aumento dessas subpopulações no sangue periférico, com consequente produção de IFN- e IL-10, tem sido associado à presença de uma resposta protetora contra o parasito, com ativação dos macrófagos, lise celular e redução da morbidade (BOURREAU et al., 2002; GUARGA et al., 2002; REIS et al., 2006; BARBIERI et al., 2007; LEAL et al., 2014).

A presença de Linfócitos B CD79+ foi inferior à encontrada nas subpopulações de linfócitos T, o que pode estar associado a maior participação dessa segunda linhagem celular na resposta inflamatória local, por outro lado não excluindo assim, a participação de linfócitos B. Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos observados por Costaglioli e colaboradores (2016), que também descrevem um

número menor de animais com imunomarcção de linfócitos B no miocárdio de cães com LV. Apesar da redução do número de animais com presença de linfócitos B detectados, a correlação positiva entre a presença de linfócitos B, com a inflamação e a presença do parasito no tecido, também podem estar associadas com a ocorrência de lesão no tecido, embora sua participação estar sendo menos expressiva naquele local.

A imunomarcção de IgG não apresentou correlação com a intensidade do infiltrado inflamatório, porém foi correlacionada com a presença do parasito. Houve uma correlação positiva entre a imunomarcção de CD79+ e IgG, o que pode ser justificado pelo fato de ambos participarem da resposta humoral, considerada não-protetora (PINELLI et al., 1994). Apesar de a imunomarcção de IgG no miocárdio de cães com LV não ter sido previamente descrita, Gomes e colaboradores (2012), avaliando a musculatura esquelética de cães com LV observaram imunomarcção de IgG em 65% (12/17) dos cães. Da mesma forma que no presente estudo, os autores não observaram imunomarcção para imunoglobulinas em todos os cães com alterações histopatológicas, sugerindo que, se a imunidade humoral é importante no desenvolvimento das lesões musculares, o processo inflamatório não é desencadeado unicamente por imunocomplexos circulantes. Embora os autores tenham referido a presença de participação da resposta humoral no tecido muscular de cães com LV (GOMES et al., 2012), no presente estudo a participação também ocorreu, porém menos evidente.

Não houve correlação entre a detecção de INOS e a presença do parasito ou a intensidade do infiltrado inflamatório nos fragmentos avaliados, uma vez que dos seis fragmentos em que se observaram imunomarcção para INOS em três foram identificados parasitas, confirmando os resultados de um estudo prévio realizado no baço de cães com LV (DOS SANTOS et al., 2011), que também não observaram correlação com a número de parasitos no tecido. Zafra et al. (2008), observaram correlação negativa entre o número reduzido de formas amastigotas e a alta expressão de INOS na pele de cães com LV, fato também identificado em um

estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, onde níveis elevados de INOS foram identificados na pele de cães assintomáticos quando comparados aos sintomáticos (dados não publicados), sugerindo que a produção de INOS por macrófagos está relacionada ao controle do parasitismo (SISTO et al., 2001, ZAFRA et a., 2008; DOS SANTOS et al., 2011). Sanches et al. (2014), não observaram diferença entre a produção de INOS no linfonodo e baço de cães sintomáticos e assintomáticos, porém descreveram menor carga parasitária mediante um ambiente com altos níveis de INOS no linfonodo e no baço desses animais.

Apesar das metaloproteinases auxiliarem na resposta imune (VISSE; NAGASE, 2003), a exacerbação de sua produção pode facilitar a disseminação do agente no hospedeiro (OPDENAKKER et al., 2001; ELKINGTON et al., 2005). A MMP-2 foi detectada em 35% (7/20) dos animais avaliados, sendo observada em 12,5% (10/80) do total de fragmentos avaliados, tendo o AD a região com maior incidência de imunomarcagem, apesar de não ter sido evidenciada diferença estatística entre as regiões avaliadas. A correlação positiva entre a intensidade do infiltrado inflamatório com a imunomarcagem de MMP-2, sugere a participação da mesma no processo inflamatório local, contudo não apresentando correlação com a presença do parasito, uma vez que não foi possível observar correlação com a presença do agente. Até onde sabemos, o presente estudo foi o primeiro a avaliar a presença de MMP-2 no miocárdio de cães com LV, porém aumento nos níveis de MMP-2 e MMP-9 já foram correlacionados com a patogênese da doença no sistema nervoso central de cães com a doença (MACHADO et al., 2010; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2011). A inflamação associada à presença de MMP-2 no miocárdio foi avaliada em ratos infectados por *T. cruzi*, que observaram menores danos e redução da carga parasitária na tecido cardíaco nos animais tratados com inibidores das metaloproteinases, quando comparados aos animais com níveis normais no miocárdio (GUTIERREZ et al., 2008).

No que diz respeito à quantificação de interleucinas no miocárdio dos cães com LV, não foi verificada diferença entre os níveis de IL-7, IL-10, IL-15 e

TNF- $\alpha$  em cães infectados e nos animais do grupo controle, independente da presença ou não do parasita no miocárdio. Por outro lado, os níveis de IL-4, IL-12, IFN- $\gamma$  foram menores em cães infectados em relação ao grupo controle, independente da presença ou não do parasita no miocárdio. Uma resposta protetora em cães com LV está diretamente relacionada à liberação de citocinas como IL-7, IL-12, IL-15, IFN- $\alpha$  e TNF- $\gamma$ , desenvolvendo-se assim uma resposta do tipo Th1 ou protetora, com consequente produção de óxido nítrico pelos macrófagos e controle do parasitismo (GESSNER et al., 1993; BARBIERI et al., 2006; HOSEINS et al., 2016; PINELLI et al., 1994; STRAUS-AYALI et al., 2005, RODRIGUEZ-CORTES et al., 2016). Desta forma, cães assintomáticos possuem uma maior expressão de IFN- $\gamma$  (ALVES et al., 2009; BARBOSA et al., 2011; BARBIERI et al., 2007). Por outro lado, a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e IL-10, têm sido associadas ao desenvolvimento de uma resposta imune humoral (Th2), com replicação do parasito e desenvolvimento da doença clínica (MANNA et al., 2006; BARBIERI, 2007, CUMMINGS et al., 2009; LEAL et al., 2014; HOSEIN et al., 2016).

O presente estudo, até onde é de nosso conhecimento, é o primeiro a realizar uma avaliação da resposta inflamatória pela quantificação de citocinas no miocárdio de cães com LV, entretanto, os resultados não permitiram identificar um padrão de resposta imune no miocárdio de cães com LV baseado na quantificação de interleucinas. Além do fato de não ter havido diferença entre grupo experimental e controle em relação a algumas interleucinas, outras estavam menos expressas nos cães com LV. Uma possível explicação para estas observações pode ser a baixa carga parasitária observada no miocárdio destes animais, que não foi suficiente para desencadear uma resposta imune local passível de ser identificada pelos métodos empregados no presente estudo. A avaliação do perfil sistêmico de citocinas não foi realizado em paralelo ao estudo da avaliação miocárdica, o que pode ter contribuído para a dificuldade da compreensão da resposta naquele local.

Estudos pretéritos têm demonstrado diferentes respostas imunológicas incitadas em diversos tecidos de cães com LV (REIS et al., 2006; RODRIGUEZ-CORTES et al., 2016), principalmente aqueles que são considerados alvos durante o desenvolvimento da doença, como baço, fígado, medula óssea, linfonodo e pele (RODRIGUÉZ-CORTES et al., 2016), o que sugere a necessidade da comparação da resposta sistêmica ou compartimentalizada, para a melhor elucidação das alterações encontradas no miocárdio.

## **7. Conclusão**

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem a presença de alterações miocárdicas como sendo comuns em cães com LV, associada a uma resposta celular e humoral no tecido cardíaco.

Novos estudos avaliando paralelamente a presença de inflamação miocárdica e o comportamento dessas citocinas circulantes em órgãos alvos, com atividade imunológica são indicados para confirmação da resposta imunológica presente no miocárdio de cães acometidos por LV.



## 8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.B.; LINHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, p. 288 e 297, 2008.

AJELLO, P., CATARSINI, O., 1976. A case of leishmaniosis in a dog with muscular and cardiac symptoms. In: Atti della Societa Italiana delle Scienze Veterinarie 30, Taormina. **Proceedings...** Taormina:, 1976. p.368-374.

ALVES, G.B.B.; PINHO, F.A.; SILVA, S.M.M.S.; CRUZ, M.S.P.; COSTA, F.A.L. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmanis (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, n.3, p.310-315, 2010.

ANDRADE, H.M.; TOLEDO, V.P.C.P.; PINHEIRO, M.B.; GUIMARÃES, T.M.P.D.; OLIVEIRA, N.C.; CASTRO, J.A.; SILVA, R.N.; AMORIM, A.C.; BRANDÃO, R.M.S.S.; YOKO, M.; SILVA, A.S.; DUMONT, K.; RIBEIRO Jr., M.L.; BARTCHEWSKY, W.; MONTE, S.J.H. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs infected with *L. infantum (=L. chagasi)* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.83-90, 2011.

BADARO, R.; BENSON, D.; EULALIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, S.J. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, n.173, p.758-761, 1996.

BANETH, G; KOUTRINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v.24, n.7, p.324-330, 2008.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Canine Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. p.735-748.

BARBOSA, M.A.G.; ALEXNADRE-PIRES, G.; SOARES-CLEMENTE, M.; RODRIGUES, O.R.; VILLA, T.; DA FONSECA, I.P.; ALVES, L.C.; SANTOS-GOMES, G.M.; 2006. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **Journal of Comparative Pathology**, v.145, p.336-344, 2011.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; NETO, A.G.F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART USP, 1976. 239p.

BOURREAU, E.; COLLET, M.; PREVOT, G.; MILON, G.; ASHIMOFF, D.; HASAGEWA, H. IFN-gamma producing CD45RA+CD8+ and IL-10 producing CD45RA-CD4+ T cells generated in response to LACK in naive subjects never exposed to *Leishmania*. **European Journal of Immunology**. v.32, p.510-520, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120p.

CAMACHO, A.A.; MUCHA, C.J. Semiologia do sistema circulatório de cães e gatos. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária. A arte do diagnóstico**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. cap.6, p.246-273.

COLOMBO, F.A.; ODORIZZI, R.M.; LAURENTI, M.D.; GALATI, E.A.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v.190, p.267-274, 2011.

COSTALGLIOLA, A.; PIEGARI, G.; OTROCKA-DOMAGALA, I.; CICCARELI, D.; IOVANE, V.; OLIVA, G.; RUSSO, V.; RINALDI, L.; PAPRELLA, S.; PACIELLO, O. Immunopathological features of canine myocarditis associated with *Leishmania infantum* infection. *Biomed Research International*. 6p. 2016.

CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L.; FIORELLI, A.; STOLF, N.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas Disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **The Journal of Clinical Investigation**, v.98, n.8, p.1709-1712, 1996.

CUMMINGS, H.E.; TULADHAR, R.; SATOSKAR, A.R. Cytokines and Their STATs in Cutaneous and Visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Informe técnico, doença de Chagas**. 2005. 4p. Disponível em <[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/outros/if\\_chagas05.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/outros/if_chagas05.pdf)>. Acesso em 10 julho de 2016.

DANTAS-TORRES, F. Canine Leishmaniosis in South America. **Parasites & vectors**, v.26, n.2, supl.1, 2009. Disponível em <<http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S1>>. Acesso em 10 julho de 2016.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.27, n.5, p.305-318, 2004.

DOS SANTOS, F.P.; PASCON, J.P.E.; PEREIRA, D.T.P.; ANJOS, B.L.; MISTERI, M.L.A.; SILVEIRA, I.D.; PORCIUNCULA, M.L.. Clinical and histopathological features of myocarditis in dogs with visceral leishmaniasis, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.67, p.1519-1527, 2015.

DOS SANTOS, F.R.; VIEIRA, P.M.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C.C. 2011. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of INOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Parasitology Research**, v.108, p.1397-1403, 2011.

ELKINGTON, P.T.G.; O'KANE, C.M.; FRIEDLAND, J.S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. **Clinical and Experimental Immunology**. v.142, p.12-20, 2005.

FEITOSA, F.L.F. Exame físico geral ou de rotina. In: \_\_\_\_\_, **Semiologia Veterinária. A arte do diagnóstico**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. cap.4, p.65-86.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, ano V, n.28, p.36-44, 2000.

FONSECA, S.G.; REIS, M.M.; COELHO, V.; NOGUEIRA, L.G.; MONTEIRO, S.M.; MAIRENA, E.C.; BACAL, F.; BOCCHI, E.; GUILHERME, L.; ZHENG, X.X.; LIEW, F.Y.; HIGUCHI, M.L.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Locally Produced Survival Cytokines IL-15 and IL-7 may be Associated to the Predominance of CD8+ T cells at Heart Lesions of Human Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p.362-371, 2007.

FONT, A.; DURALL, N.; DOMINGO, M.; CLOSA, J.M.; MASCORT, J.; FERRER, L. Cardiac tamponade in a dog with visceral leishmaniasis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 29, p. 95-100, 1993.

GESSNER, A.; VIETH, M.; WILL, A.; SCHROPPEL, K.; ROLLINGHOFF, M. Interleukin-7 enhances antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. **Infection and Immunity**, v.61, p.4008-4012, 1993.

GOMES, A.A.D.G.; LAURENTI, M.D.; FERRARO, G.C.; CAMARGO, M.H.B.; COSTA, D.C.; MACHADO, G.F.; PERRI, S.H.V.; MARCONDES, M. 2012. Subclinical muscle injuries in dogs infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*

*chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v.5, n.108-115, 2012.

GUEDES, P.M.M.; GUTIERREZ, F.R.S.; MAIA, F.L.; MILANEZI, C.M.; SILVA, G.K.; PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.S. IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.4, 2010.

GUTIERREZ, F.R.S.; LALU, M.M.; MARIANO, F.S.; MILANEZI, C.M.; CENA, J.; GERLACH, R.F.; SANTOS, J.E.T.; TORRES-DUEÑAS, D.; CUNHA, F.Q.; SCHULZ, R.; SILVA, J.S. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The journal of infectious disease**. v.197, p.1468-1476, 2008.

HOSEIN, S.; BLAKE, D.P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniasis. **Parasitology**, 21p, 2016.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. **Imunobiologia o sistema imune na saúde e na doença**. 6.ed. São Paulo: Artmed Editora, 2007.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old World Canine Leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.15, n.7, p.949-959, 1993.

LARANGEIRA, D.F. **Avaliação da imunidade humoral e celular em cães naturalmente infectados com *Leishmania (L.) chagasi* e sua correlação com a transmissibilidade para o vetor**. 2009. 79f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

LEAL, G.G.A.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; CARNEIRO, C.M.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, A.; FRANCISCO, A.F.; CARDOS, J.M.; MATHIAS, F.A.S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W.; REIS, A.B. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**. v.205, p.472-482, 2014.

LÓPEZ-PEÑA, M.; ALEMAÑ, A.; MUÑOZ, F.; FONDEVILA, D.; SUÁREZ, M.L.; GOICOA, A.; NIETO, J.M. 2009. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.51, n.20, 2009.

MACHADO, F.S.; SOUTO, J.T.; ROSSI, M.A.; ESPER, L.; TANOWITZ, H.B.; ALIBERTI, J.; SILVA, J.S. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. **Microbes and Infection**, v.10,

p.1558-1566, 2008

MACHADO, G.F.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; MARCONDES, M.; PERRI, S.H.V.; VASCONCELOS, R.O. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.136, p.340-345, 2010.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; FABRIZIO, V.; MANZILLO, V.F.; MICHELE, P.L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A.E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.142, p.271-280, 2006.

MARANGONI, N.R.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; PERRI, S.H.; MACHADO, G.F. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.33, p.330-334, 2011.

MARCOS SÁNCHEZ, F.; VÁZQUEZ GARCÍA, A.; LLORENTE DOMINGO, P.; HERNÁNDEZ LANCHAS, C.; SÁNCHEZ DE LA NIETA, J.; DÚRAN PÉREZ-NAVARRO, A. Pericardial effusion in the course of visceral leishmaniasis. **Anales de Medicina Interna**, v.6, n.164, 1989.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNÁNDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 48, 3-4, p. 209-220, 1995.

MELO, F.A. **Alterações da matriz celular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados**, 2005. 93f.Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2005.

MELO, G.D.; MARANGONI, R.N.; MARCONDES, M.; LIMA, V.M.F.; MACHADO, G.F. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniasis: A preliminary report. **The veterinary journal**, v.188, p.243-245, 2011.

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.162, p.248-256, 2009.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.67-83.

MOFREDJ, A.; GUERIN, J.M.; LEIBINGER, F.; MASMOUDI, R. Visceral leishmaniasis with pericarditis in an HIV-infected patient. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v.34, p. 151-153, 2002.

MORAIS, C.F.; DUARTE, M.I.S.; CORBETT, C.E.P.; REIS, M.M. Alterações morfológicas cardíacas no curso da leishmaniose visceral humana. Estudo baseado em 16 casos de necropsia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** v. 51, n. 6, p. 441-445, 1988.

OPDENAKKER, G.; DE STEEN, P.E.V.; DUBOIS, B.; NELISSEN, I.; COILLIE, E.V.; MASURE, S.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. **Journal of Leukocyte Biology**, v.69, p.851-859, 2001.

PACIELLO, O.; OLIVA, G.; GRADONI, L.; MANNA, L.; MANZILLO, V.F.; WOJCIK, S.; TTAPANI, F.; PAPRELA, S. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania infantum* infection. **Neuromuscular disorders**. v.19, p.124-130, 2009.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, n.1, p.229-235, 1994.

PUERTO-ALONSO, J.L.; MOLINA-RUANO, F.J.; GÓMEZ-SOTO, F.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, F. Leishmaniasis visceral con afectación cardíaca en un paciente inmunocompetente. **Medicina Clínica**, v.127, n.13, p.519, 2006.

REIS, D.D.; JONES, E.M.; TOSTES, S.J.; LOPES, E.R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G.; McCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. n.48, p.637-644, 1993.

REIS, M.M.; HIGUCHI, M.D.; BENVENUTI, L.A.; AIELLO, V.D.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTI, G.; PILEGGI, F. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clinical Immunology and Immunopathology**, n.83, p.165-172, 1997.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally

infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.112, p.102-116, 2006.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINCK, W.; TAFURI, W.L.; CORREA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis, **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.128, p.87-95, 2009.

RODRÍGUEZ-CORTES, A.; CARRILLO, E.; MARTORELL, S.; TODOLFI, F.; OJEDA, A.; MARTÍNEZ-FLOREZ, A.; URNIZA, A.; MORENO, J.; ALBEROLA, J. Compartmentalized immune response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the disease, **PLoS One**, v.11, n.5, 13p, 2016.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1993.

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos de Imunologia**, 10.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004, 490 p.

ROSA, F.A.; LEITE, J.H.A.C.; BRAGA, E.T.; MOREIRA, P.R.R.; BALTAZAR, F.H.; BIONDO, A.W.; PADUA, P.P.M.; VASCONCELOS, R.O.; CAMACHO, A.A.; FERREIRA, W.L.; MACHADO, G.F.; MARCONDES, M. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*. **Veterinary Pathology**, v.5, n.3, 2014.

SANCHEZ, F.; TOMOKANE, T.; DA MATTA, V.; MARCONDES, M.; CORBETT, C.; LAURENTI, M.D. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. **Acta Veterinaria Scandinava**. v.4, 7p, 2014.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, 88, p.21-30, 2002.

SHERLOCK, I.A. Ecological Interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.6, p.671-683, 1996.

SHRIVASTAVA, R.; SINHA, P.R.; SINGH, V.P.; SUNDAR, S. Echocardiographic evaluation of cardiac status in Indian visceral leishmaniasis patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.101, p.429-432, 2007.

SILVA, B.C.; RACHID, M.A.; VIEIRA, F.G.; FIGUEIREDO, M.M.; VALLE, G.R.;

TAFURI, W.L.; TOLEDO JÚNIOR, J.C.; RIBEIRO, V.M. Chronic pericarditis in a naturally *Leishmania (Leishmania) chagasic* infected dog. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.2, n.2, p.107-109, 2009.

SISTO, M.; BRANDOMISIO, O.; PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**. v.24, p.247-254, 2008.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

TORRENT, E.; LEIVA, M.; SEGALÉS, J.; FRANCH, J.; PEÑA, T.; CABRERA, B.; PASTOR, J. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.46, p.549-552, 2005.

TORRES-NETO, R.; RODRIGUES, M.M.P.; AMORIM, R.L.; CONCEIÇÃO, L.G.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FRANCO, S.R.V.S. Expression of CD3 and CD79a cell markers in exfoliative and ulcerative skin lesion in dogs with leishmaniasis. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.165-174, 2008.

UMEZAWA, E.S.; SOUZA, A.I.; PINEDO-CANCINO, V.; MARCONDES, M.; MARCILI, A.; CAMARGO, L.M.A.; CAMACHO, A.A.; STOLF, A.M.S.; TEIXEIRA, M.M.G. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta Tropica**, v.111, n.1, p.15-20, 2009.

VAMVAKIDIS, C.D.; KOUTINAS, A.F.; KANAKOUDIS, G.; GEORGIADIS, G.; SARIDOMICHELAKIS, M. Mastigatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Record**, v.146, n.24, p.698-703, 2000.

VISSE, R; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function and Biochemistry. **Circulation research**, v.92, p.827-839, 2003.

WEAVER, C.T.; HATTON, R.D.; MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annual Reviews Immunology**, 25, p.821-852, 2007.



ZABALA, E.E.; RAMÍREZ, O.J.; BERMÚDEZ, V. Leishmaniasis visceral en un canino. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, v.46, n.2, p.43-49, 2005.

ZAFRA, R.; JABER, J.R.; PÉREZ-ECIJA, R.A.; BARRAGÁN, A.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; PÉREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.123, p.353-359, 2008.