

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

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE
SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA PELA
TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA EM CÃES
VACINADOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Milla Bezerra Paiva
Médica veterinária

ARAÇATUBA-SP
2012

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

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE
SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA PELA
TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA EM CÃES
VACINADOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Milla Bezerra Paiva

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba- UNESP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal).

ARAÇATUBA-SP
2012

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

Paiva, Milla Bezerra

P149a Avaliação da resposta imune celular de sangue periférico e medula óssea pela técnica de imunocitoquímica em cães vacinados para Leishmaniose visceral canina / Milla Bezerra Paiva. – Araçatuba: [s.n], 2012.

73 f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2012.

Orientador: Prof^a Maria Cecília Rui Luvizotto

1. Cão. 2. Imunocitoquímica. 3. Leishmania. 4. Linfócito. 5. Medula óssea. 6. Sangue periférico.

CDD 636.708982

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Avaliação da resposta imune celular de sangue periférico e medula óssea pela técnica de imunocitoquímica em cães vacinados para Leishmaniose Visceral Canina

AUTORA: MILLA BEZERRA PAIVA

ORIENTADORA: Dr.ª MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO

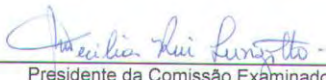
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica) pela Comissão Examinadora.


Dr. FÁBIO DOS SANTOS NOGUEIRA


Dr.ª SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM


Dr.ª MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 14 de agosto de 2012.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr.ª MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MILLA BEZERRA PAIVA - Rio de Janeiro – RJ, 14 de junho de 1983. Coursou o ensino fundamental e médio no Colégio Nossa Senhora Rainha dos Corações. Ingressou no curso de Medicina Veterinária em 2004.1 pela Universidade Castelo Branco (UCB)- RJ e recebeu o título de Médica Veterinária em 2008.2. Durante a graduação, foi monitora das disciplinas de Microbiologia e Patologia, além de fazer três estágios extra-curriculares no Departamento de Patologia Veterinária da UNESP-Botucatu, estágio no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman (RJ) também no Departamento de Patologia Veterinária e estágio na Clínica Escola de Pequenos Animais da UCB-RJ. Realizou aperfeiçoamento profissional na área de Patologia Veterinária no ano de 2009 na UNESP-Araçatuba. Iniciou o curso de pós-graduação em Ciência Animal na UNESP-Araçatuba no ano de 2010, sendo bolsista CAPES, CNPq e posteriormente bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

EPIGRAFE

“Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

(Dalai Lama)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, minha irmã e meu sobrinho, que se sacrificaram para me ajudar a evoluir e concluir esta etapa tão importante para minha formação profissional, sempre com muito amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sérgio Luis de Almeida Paiva e Sandra Suely Bezerra Paiva, que me ensinaram a ter perseverança e dedicação, mas sempre com muito respeito e humildade. Por confiarem em minhas escolhas e me apoiarem nos caminhos da vida.

A minha irmã Belle Bezerra Paiva, que sempre me ensinou a ter os pés no chão ao tomar minhas decisões. Por sempre ter ajudado e estado do meu lado com palavras confortantes nos momentos em que pensei em desistir.

Ao meu sobrinho Gabriel Paiva de Mello, por sempre me dar tanto amor e alegria gratuitos sem esperar nada em troca.

Aos meus primos, por nunca deixarem diminuir meu contato com as raízes, sempre presentes com muita alegria e amor.

A minha orientadora Maria Cecília Rui Luvizotto, por ter me dado liberdade para que eu fizesse minhas escolhas e aprendesse com elas. Por ter acreditado e confiado em mim, sempre me incentivando a crescer.

À amiga Gabriela Mayumi Gouveia, por ter estado ao meu lado nesta etapa, independente do problema ou da diversão. Sou muito grata a toda a ajuda na execução deste projeto.

Aos meus amigos queridos, por sempre me apoiarem e me alegrarem do jeito que fosse possível. Por me aceitarem como sou independente do humor ou da fase que eu estava passando. Por me darem conselhos quando eu mais precisei. Meus irmãos de escolha.

Ao doutorando Heitor Flávio Ferrari, por ter me ajudado na etapa de coleta do material, sempre muito solícitamente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido neste período de realização do mestrado.

À UNESP- Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba- por ter me acolhido e auxiliado a completar esta etapa na minha vida profissional.

À Seção de Pós-Graduação da UNESP- Araçatuba, por sempre ter me ajudado na parte burocrática com muita paciência e informação

Às funcionárias da biblioteca, que sempre estiveram dispostas a me ajudar a encontrar minhas fontes de consulta, sempre com muito bom humor e profissionalismo. Também por terem sido tão gentis em fazer as correções da minha dissertação.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse este projeto com palavras de carinho, ações mínimas ou primordiais, abraços, sorrisos ou críticas construtivas.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1.1. Epidemiologia.....	15
1.2. Ciclo biológico.....	18
1.3. Resposta imune.....	19
1.4. Controle e diagnóstico da LV.....	22
1.5. Vacinação.....	23
1.6. Cito inclusão.....	25
1.7. Objetivos.....	26
1.8. Referências.....	27
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA DE CÃES VACINADOS PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	39
Resumo.....	39
Abstract.....	40
Introdução.....	41
Material e métodos.....	42
Resultados.....	44
Discussão.....	48
Conclusão.....	50
Referências bibliográficas.....	51
CAPÍTULO 3- CITO INCLUSÃO DE CAPA LEUCOCITÁRIA E MEDULA ÓSSEA DE CÃES: PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA.....	56
Resumo.....	56
Abstract.....	57
Introdução.....	58
Material e métodos.....	60

Resultados e discussão	61
Conclusão	65
Referências bibliográficas	65
APÊNDICE A- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	69

LISTA DE TABELAS

	Página
Casos humanos confirmados de LV no Brasil (2007-2010)	17
Casos humanos confirmados de LV na Região Sudeste (2007-2010)	17
Anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3.....	43
Percentual de imunomarcção dos anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3 na capa leucocitária dos grupos de animais negativos (GI), vacinados (GII) e positivos (GIII) para a LVC.....	45
Percentual de células positivas para os anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3 na medula óssea dos grupos de animais negativos (GI), vacinados (GII) e positivos (GIII) para a LVC.....	47

LISTA DE FIGURAS

Página

Reação de imunocitoquímica para os anticorpos anti-CD4 (A) e anti-CD8 (B) em amostra de capa leucocitária.....46

Reação de imunocitoquímica para o anticorpo anti-CD8 na medula óssea.....48

Ilustração de amostras de capa leucocitária e medula óssea. Aspecto das cito inclusões de capa leucocitária (A) e medula óssea (B) à macroscopia.....64

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA PELA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA EM CÃES VACINADOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

RESUMO- O objetivo dessa pesquisa foi analisar a resposta imune celular de cães negativos (GI), vacinados (GII) e positivos (GIII) para a LVC por meio da imunocitoquímica para os anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3 na capa leucocitária e medula óssea. Na capa leucocitária, quando comparados os grupos entre si, não houve diferença estatística para as células T CD4. Os grupos I e III apresentaram maior imunomarcagem para anti-CD8. Embora não tenha sido observada diferença estatística ($p > 0,05$), a imunomarcagem para FOXP3 mostrou os menores valores percentuais nos três grupos estudados. Os grupos I e II apresentaram maior imunomarcagem para anti-CD4, seguida do anti-CD8, quando comparados os anticorpos em cada grupo separadamente. Nos animais do grupo III, foi observada maior expressão de células imunorreativas ao anti-CD8 seguida do anti-CD4, e valores reduzidos para FOXP3. Nas células da medula óssea não foi verificada diferença estatística na expressão dos anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3 quando comparados os grupos entre si. Na análise comparativa entre os anticorpos testados, entretanto, foi observada maior marcação para o anticorpo anti-CD4 em GI, ausência de diferença estatística em GII e maior percentual de células positivas para anti-CD8 em GIII. Os valores de FOXP3 também se mantiveram reduzidos em todos os grupos. A técnica de cito inclusão foi padronizada com sucesso, obtendo 68% de viabilidade para amostras da capa leucocitária e medula óssea. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a presença de células T CD4+ e CD8+ em animais vacinados, em associação à expressão reduzida do marcador de células T regulatórias FOXP3, sugerem que a vacina Leishmune[®] exerce um efeito estimulatório na resposta imune celular de cães, promovendo um incremento da resposta protetora Th1.

Palavras-chave: cão, imunocitoquímica, *Leishmania*, linfócito, medula óssea, sangue periférico.

IMMUNOCYTOCHEMICAL EVALUATION OF CELLULAR IMMUNE RESPONSE FROM PERIPHERAL BLOOD AND BONE MARROW IN DOGS IMMUNIZED FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY: The aim of this research was to analyze the cellular immune response of negative (GI), vaccinated (GII) and positive (GIII) dogs for VCL by immunocytochemistry for CD4, CD8 and FOXP3 antibodies on the buffy coat and bone marrow. In the buffy coat, when compared the three groups together, there was no statistical difference in CD4+ T cells. Groups I and III showed higher immunostaining for anti-CD8. Although no statistical difference was observed, immunostaining for FOXP3 showed the lowest percentages in all three groups. Groups I and II showed higher immunoreactivity to anti-CD4 followed by anti-CD8 antibodies when compared each group separately. In group III, we observed increased expression of immunoreactive cells to anti-CD8 followed by anti-CD4, and reduced values for FOXP3. In bone marrow cells there was no statistical difference in the expression of anti-CD4, anti-CD8 and FOXP3 antibodies in the three groups. The comparative analysis between the antibodies tested, however, revealed greater cellularity expressing anti-CD4 in GII, and higher percentage of anti-CD8 positive cells in GIII. The group II showed no statistical difference between the antibodies analyzed. FOXP3 values also remained low in all groups. The results of this study indicate that the presence of CD4 + and CD8 + T lymphocytes in the vaccinated animals, combined with reduced expression of the marker of regulatory T cells FOXP3 suggest that Leishmune[®] vaccine exerts a stimulatory effect on immune response of dogs, promoting an increase in the protective Th1 response.

Keywords: bone marrow, canine, immunocytochemistry, Leishmania, lymphocyte, peripheral blood.

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Epidemiologia

A leishmaniose é uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Leishmania* sp. (ALVAR et al., 2004; ROSS,1903), pertencentes à classe *Kinetoplasta*, ordem *Trypanosomatida* e família *Trypanosomatidae* (REY, 2001). O complexo *Leishmania donovani* é constituído pelas espécies *L. donovani* (Índia e África Central) e *L. infantum* (Américas, Oriente Médio, Ásia Central, China e Região Mediterrânea) e é responsável pela Leishmaniose Visceral (LV) no Velho Mundo e Novo Mundo (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011).

A leishmaniose visceral é transmitida, no novo mundo, por insetos flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, com destaque para *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON et al.,1987; MOURA, 2007) e, mais recentemente, *L. cruzi* (DE ALMEIDA et al., 2010). Estes vetores mostraram-se altamente adaptados aos cenários brasileiros urbanos e periurbanos nos últimos 30 anos, promovendo o aumento de casos de leishmaniose visceral à medida que as cidades tornavam-se mais populosas. Este fenômeno foi observado em outros países, como a Itália, Marrocos, Iran e México (HARHAY et al., 2011).

Epidemiologicamente, a doença possui dois diferentes ciclos: o zoonótico e o antroponótico. A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ), causada pela *L. infantum*, é transmitida por vetor flebotomíneo e possui como reservatório principal os cães. Neste ciclo há ausência de parasitismo sanguíneo em humanos. Os casos de leishmaniose visceral zoonótica são mais encontrados na África, Região Mediterrânea e nas Américas. A leishmaniose visceral antroponótica, associada à *L. donovani*, é caracterizada pelo parasitismo sanguíneo e cutâneo acentuado e presença de vetor antropofílico, tornando os humanos reservatórios do parasito e, por

consequência, transmissores potenciais da doença (antroponose legítima). (ADLER; THEODOR, 1932; ADLER, 1940; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001, PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os casos de LVZ em humanos estão relacionados em sua maioria a pacientes portadores do vírus HIV, transplantes de órgãos infectados (receptores imunodeprimidos) e crianças. Além disso, mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral humana ocorrem na Índia, Sudão Bangladesh e Brasil. Nas Américas, 90% dos casos estão localizados no Brasil (HARHAY et al., 2011; MILES, 1999).

A expansão da LV na Europa, Ásia, África e Américas deve-se a um conjunto de fatores, como a migração de pessoas e cães infectados para locais onde existe o vetor, alterações no habitat dos flebotomíneos devido ao aquecimento global, maior incidência de viajantes que se deslocam com seus cães, urbanização da doença após desmatamento e frequente co-infecção em indivíduos HIV positivos (DUPREY et al., 2006; EVANS; KEDZIERSKI, 2012; HARHAY et al., 2011; MAGUILL, 1995; WITT et al., 2009).

No Brasil, foi relatada pela primeira vez em 1913, no estado de Mato Grosso (ALENCAR; DIETZE, 1991). De 1980 a 2005, cerca de 82% dos casos de LV se localizaram na região nordeste. No ano de 2005, porém, o percentual de casos positivos que era de 18% passou a 44% nas demais regiões e desde então tem sido observada em todas as regiões do território brasileiro (BRASIL, 2006), como descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Casos humanos confirmados de LV no Brasil (2007-2010)

Regiões	2007	2008	2009	2010
Região norte	847	815	709	636
Região nordeste	1741	1739	1754	1662
Região Sudeste	679	723	641	629
Região Sul	3	0	8	2
Região centro-oeste	331	322	275	303

Fonte: Sinan/SVS/MS - atualizado em 23/7/11.

Na região sudeste, os estados de Minas Gerais e São Paulo destacam-se por apresentarem números muito superiores de LV confirmados, em comparação com as demais (Tabela 2).

Tabela 2- Casos humanos confirmados de LV na Região Sudeste (2007-2010)

Região Sudeste	2007	2008	2009	2010
Minas Gerais	421	471	464	469
São Paulo	256	250	169	157
Espírito Santo	0	2	5	3
Rio de Janeiro	2	0	3	0

Fonte: Sinan/SVS/MS - atualizado em 23/7/11.

No estado de São Paulo, de 1999 a 2006, a doença em humanos já havia sido registrada em 34 municípios das regiões de Araçatuba, Bauru, Marília e Presidente Prudente. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC), até 2002, foi registrada em 29 municípios do estado e a prevalência de casos humanos foi maior em municípios onde a doença já havia sido detectada em cães. O município de Araçatuba é responsável pelo maior número de casos do

estado e a expansão da doença se explica pela adaptação do vetor em novos municípios (CAMARGO-NEVES, 2004; SUCEN; CCD, 2006).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença de caráter zoonótico e está fortemente relacionada ao aumento de casos em humanos, por este motivo é considerada de grande importância em Medicina Veterinária e Saúde Pública (BRASIL, 2006; DEANE; DEANE, 1962). A transmissão da LVC é feita principalmente pelos vetores flebotomíneos, porém já foram observadas transmissões verticais em animais naturalmente infectados e por transfusão sanguínea (BOGGIATO et al., 2011; SILVA et al., 2009).

Os sinais clínicos principais da LCV são: onicogribose, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia, alopecia, dermatites, coriza, apatia, caquexia, diarreia, artrites, conjuntivite e hiperqueratose. Os cães podem ser divididos quanto à presença de sinais clínicos em assintomáticos (ausência de sinais clínicos característicos da LVC), oligossintomáticos (quantidade reduzida de sinais clínicos) e sintomáticos (presença dos sinais mais comuns da doença) (BRASIL, 2006).

1.2 Ciclo biológico

O ciclo parasitário da *Leishmania* spp. ocorre quando o vetor ingere as formas amastigotas presentes no interior de células fagocíticas ou em meio extracelular ao fazer o repasto sanguíneo. O protozoário diferencia-se em formas flageladas no interior do trato digestório do inseto, denominadas promastigotas, que representam a forma infectante aos hospedeiros vertebrados. Ao migrarem para a probóscide do inseto, passam para o hospedeiro durante o próximo repasto sanguíneo, onde se multiplicam e se diferenciam em formas amastigotas. Durante o processo de multiplicação dos parasitos, ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando as formas

amastigotas que infectam novas células e perpetuam o ciclo parasitário (CUNNINGHAM, 2002; KILLICK-KENDRICK, 1990).

1.3 Resposta imune

A resposta imune induzida na infecção por *Leishmania* em cães e humanos pode ser do tipo humoral e/ou celular. A resposta humoral se dá pelo aumento na produção de imunoglobulinas, especialmente IgG, que além de ser incapaz de promover proteção contra este parasito, contribui para a progressão da doença com a produção de altas concentrações de interleucina 10 (IL-10) em modelo experimental murino (REY,2001; SHARMA; SINGH,2009).

Após internalizar em células fagocíticas do hospedeiro, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, as formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas, que driblam o primeiro mecanismo de defesa do hospedeiro ao resistirem à proteólise e degradação pelos fagolisossomos. Este processo de permanência no interior de fagócitos promove um mecanismo de escape frente à resposta imune humoral, que não é capaz de detectar os parasitos sem que os fagócitos os apresentem como antígenos (SHARMA; SINGH, 2009).

Os macrófagos e as células dendríticas desempenham diferentes funções na tentativa de destruição do antígeno, tanto na execução de ações diretas à membrana e ao material genético do parasito, quanto atuando como célula apresentadora de antígenos aos linfócitos T. A diferenciação de células T imaturas em Th1 se faz através da estimulação dessas pela interleucina 12 (IL-12), produzida por células dendríticas e macrófagos. Esta diferenciação é responsável pela resposta protetora durante a infecção por *Leishmania*, ao estimular a produção de interferon gamma (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α). Em contrapartida, a interleucina 4 (IL-4) estimula a diferenciação de linfócitos T imaturos em Th2, conferindo ao hospedeiro a suscetibilidade ao

parasito por induzir a diminuição nos níveis de IL-12 e IFN- γ (CUNNINGHAM, 2002).

Rosa et al. (2006) observaram, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real em células cultivadas do sangue periférico de cobaias, que linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ desempenham papel fundamental na indução da resposta Th1 e conseqüentemente na manutenção da resposta imune protetora em cobaias resistentes e suscetíveis à LV.

Os linfócitos T CD4⁺ são responsáveis pela produção de IFN- γ . Estudos sugerem que o papel de linfócitos T CD8⁺ é igualmente importante na imunidade protetora de hospedeiros infectados com a produção concomitante de IFN- γ , aliado à ação citotóxica, embora sua função específica não seja totalmente compreendida (GOMES-PEREIRA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2003; SMITH et al., 1991; TSAGOZIS et al., 2005).

Cães naturalmente infectados com *Leishmania* mostraram percentual inferior de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico em comparação com cães saudáveis (ALVAR et al., 2004; REIS et al., 2006). Além disso, o decréscimo de células T CD4⁺ promovia um incremento na transmissibilidade do parasito aos vetores flebotomíneos (GUARGA et al., 2000).

Em modelo experimental utilizando a citometria de fluxo, a análise da população de linfócitos de cobaias resistentes à leishmaniose visceral em cultivo *in vitro*, revelou a contribuição de células T CD8⁺ na regulação positiva de IFN- γ no estágio inicial, modulando a resposta de linfócitos T CD4⁺. As subpopulações de linfócitos poderiam contribuir para o controle da multiplicação de parasitos na fase inicial da doença (TSAGOZIS et al., 2005).

O percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ não mostrou variação importante no cultivo de células esplênicas de cobaias infectadas, submetidos à técnica de citometria de fluxo (GOMES- PEREIRA et al., 2009).

Lezama-Dávila e Gallagher (1995), em estudo com *Leishmania mexicana*, comprovaram o papel protetor dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ao

verificarem a regressão da doença em camundongos nos quais foram implantados linfócitos de animais previamente vacinados.

Rohtagi et al. (1996) elaboraram um estudo que analisou as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico, medula óssea e baço, utilizando a técnica de imuno-histoquímica. No sangue periférico, os valores de células T CD4+ foram significativamente menores nos pacientes com a doença aguda e crônica em relação ao grupo controle; já as células CD8+ apresentaram o mesmo resultado apenas na doença crônica. Na medula óssea, as células T CD4+ mostraram maiores índices nas duas fases da doença; contudo, as células T CD8+ obtiveram menores valores na doença aguda. Estes achados sugerem que diferentes compartimentos do organismo do hospedeiro são capazes de gerar resposta imune celular com diferentes perfis de linfócitos T.

Em revisão analisando a resposta imune frente à infecção por *Leishmania* spp. foi verificado que não houve diferença nas células T CD4+ no sangue periférico entre cães saudáveis e infectados pelo parasito, sugerindo que o perfil imune dessas células não pode ser utilizado como marcador prognóstico da doença. No entanto na medula óssea não foram observadas mudanças significativas nos valores de células T CD4+ e CD8+, levantando a hipótese de que o controle da infecção na medula óssea não está relacionado com a proliferação dessas subpopulações de células (MAIA; CAMPINO, 2012).

A susceptibilidade e a resistência à infecção por *Leishmania* spp. também está associada, em modelos experimentais com camundongos (BELKAID, 2002), à presença de uma subpopulação única de células T, as células T regulatórias (CD4+CD25+). Estas células estão relacionadas com a produção de IL-10 ao inibir a atuação das células T efetoras, que atuam especificamente em antígenos não próprios como os parasitos do gênero *Leishmania*. Além deste fato, ao estudar camundongos resistentes à infecção por *Leishmania* spp., Rodrigues et al. (2009) constatou que os animais com deficiência de IL-10 apresentaram cura após a melhora espontânea das lesões cutâneas, enquanto que nos que apresentavam níveis normais da citocina isto

não era observado Estes achados sugerem que as células T regulatórias possuem importante papel em promover a persistência do parasito e na promoção de infecções crônicas.

As células T regulatórias também atuam inibindo a produção de IFN- γ e IL-12 por meio de um mecanismo que requer contato direto célula a célula. (NAGASE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2009; SHARMA; SINGH, 2009). Para a identificação dessas células T, são utilizados marcadores para CD4+ e CD25+, porém é necessária a expressão conjugada do fator de transcrição FOXP3, visto que células T recentemente ativadas expressam o CD25+ (BOER et al., 2007). Embora o papel das células T regulatórias seja amplamente explorado em modelos experimentais de infecção por *Leishmania*, muito pouco se sabe sobre a relevância dessa subpopulação em animais vacinados para a LVC

1.4 Controle e diagnóstico da LV

O controle da LV, segundo recomendações da OMS, é realizado através do tratamento de pacientes humanos, eutanásia de cães infectados soropositivos para a doença e utilização de inseticidas nas residências de áreas endêmicas (PALATNIK DE SOUSA et al., 2009; TESH, 1995). A eutanásia de cães infectados reduz a prevalência da LV humana, mas estudos recentes demonstram que o uso de colares inseticidas associado à vacinação dos cães e utilização de sprays inseticidas nas residências pode substituir esta prática de controle da doença em áreas endêmicas (PALATNIK DE SOUSA; DAY, 2011).

O diagnóstico da LV pode ser feito através da demonstração do parasito em microscopia óptica, cultivo *in vitro* ou inoculação em animais, detecção do DNA parasitário, imunodiagnóstico com detecção de antígenos parasitários ou imunoglobulinas específicas e por fim testes de imunidade celular específica para *Leishmania* spp (SUNDAR; RAI, 2002).

O método de diagnóstico ideal para a LV deve possuir alta sensibilidade e especificidade, além de diferenciar pacientes com a doença aguda de assintomáticos. Precisam também ser de baixo custo e de simples realização, visando aplicação na rotina diagnóstica (CHAPPUIS et al., 2007).

Para a detecção direta do parasito, existe a citologia aspirativa de linfonodos, medula óssea e baço, que possuem alta especificidade, mas a sensibilidade é variável, com maior percentual para a citologia de baço (93 a 99%), seguida da medula óssea (53 a 86%) e por último de linfonodo (53 a 65%) (BABIKER et al., 2007; HO et al., 1948; SIDDIG et al., 1988; ZIJLSTRA et al., 1992).

Métodos para detecção de anticorpos também são amplamente utilizados, porém possuem limitações como a permanência de anticorpos para o parasito em duas situações: após a cura dos pacientes e em indivíduos saudáveis residentes de áreas endêmicas para a doença. Por isso, a detecção de anticorpos deve ser utilizada juntamente com o diagnóstico clínico para maior eficácia do método (CHAPPUIS et al., 2007).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o western blot possuem elevada acurácia diagnóstica, mas são pobremente adaptáveis ao uso na rotina diagnóstica.

Existem também diagnósticos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), porém são consideradas técnicas de alto custo e complexas, restritas principalmente a centros de pesquisa (BOELAERT et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2007).

Para facilitar o diagnóstico da doença na rotina médica e veterinária, foram desenvolvidos os testes de aglutinação direta (DAT) e o teste imunocromatográfico para o antígeno recombinante K39, que mostraram elevada sensibilidade e especificidade, além de serem de fácil aplicação e relativamente rápidos (BOELAERT et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2007).

1.5 Vacinação

O uso de vacinas contra LVC é uma importante estratégia para a redução da enfermidade canina, redução de casos de LV em humanos e auxiliando na erradicação da doença em cães (ARAÚJO *et al.*, 2008), afirmação esta comprovada por Palatnik *et al.* (2009) ao analisar o comportamento da doença antes e após a introdução da vacinação em cães nos municípios de Araçatuba-SP e Belo Horizonte-MG.

Combinações de imunização contra a LVC foram desenvolvidas e testadas, como vacinas com o parasito vivo (primeira geração), antígenos de *Leishmania* spp. purificados ou bactérias vivas recombinantes que expressam antígenos de *Leishmania* spp. (segunda geração) e plasmídios que codificam DNA antigênico.

Uma vacina de segunda geração, composta por frações glicoprotéicas purificadas isoladas de *Leishmania donovani* (FML- Fucose Manose Ligand) e adjuvante saponina, possui potencial protetor comprovado pela literatura (ARAÚJO *et al.*, 2009; SARAIVA *et al.*, 2006). Sua eficácia gira em torno de 92 a 95%, desenvolvendo uma resposta celular acentuada e bloqueando a transmissão da LVC, mesmo após 3 anos e meio da vacinação (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002; DANTAS-TORRES, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2005).

A FML-saponina segue um esquema de vacinação de três doses com intervalo de 21 dias entre elas em cães com idade mínima de quatro meses e sorologicamente negativos para LVC e revacinação anual (FORT DODGE, 2004).

Estudos comparativos utilizando a técnica de citometria de fluxo do sangue periférico observaram que cães vacinados com FML- saponina mostraram mudanças fenotípicas e aumento de células T CD8+, enquanto que cães vacinados com a leishvacina (componente antigênico de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e BCG como adjuvante) desenvolveu uma resposta mista, com mudanças fenotípicas em linfócitos T e B (principalmente linfócitos T CD4+) e ativação transitória de linfócitos T CD8+

(ARAÚJO et al., 2008). Quanto à produção de citocinas, a leishvacina produziu uma resposta mista de IFN- γ e IL-4, enquanto que a vacina FML- saponina revelou altos níveis de IFN- γ (ARAÚJO et al., 2009; LIMA et al., 2010).

Um estudo com sangue periférico de cães imunizados contra LVC cuja vacina era constituída de extrato da saliva do vetor flebotomíneo e adjuvante saponina demonstrou incremento de linfócitos T CD4+ e T CD8+ por meio da técnica de citometria de fluxo (GIUNCHETTI et al., 2008).

1.6 Cito inclusão

A cito inclusão em blocos de parafina é definida pelo ato de inserir amostras citológicas em blocos de parafina, sendo amplamente utilizada em medicina e visando a conservação e aproveitamento máximos do material coletado, promovendo maior qualidade no diagnóstico e possibilitando a utilização da amostra em testes mais específicos, como a imunocitoquímica (ARDENGH et al. 2008; LIU et al.,1998; MAYALL et al.,1997; VARSEGI; SHIGHAM, 2009). Embora amplamente utilizada e reconhecida, poucas são as informações sobre a contribuição dessa técnica para o diagnóstico em Medicina Veterinária.

Para se desenvolver e padronizar uma técnica de cito inclusão, devem-se obedecer os seguintes requisitos: manutenção da morfologia celular e arquitetura tecidual; otimização do tempo de processamento das amostras sem perda de qualidade do material; obtenção de material de reserva suficiente para a realização de testes como colorações especiais e reações de imunohistoquímica; e por fim, desenvolvimento de método simples, de custo reduzido e reprodutível (BURT et al., 1986; KULKARNI et al., 2008; NATHAN et al., 2000). Além destes requisitos, devem ser respeitadas as variáveis da adaptação da técnica para diferentes laboratórios, que dependem da estrutura física, parque de equipamentos, finalidade, material e investimento disponível

para a execução dos procedimentos (GURLEY et al., 1992; NATHAN et al., 2000).

Os materiais mais utilizados na técnica de cito inclusão são as efusões, as punções aspirativas por agulha fina (PAAF) de nódulos e/ou órgãos, secreções lavados vesicais e prostáticos (CHANDRA; CHANDRA, 2011; ENGOHAN-ALOGHE et al., 2010; KROGERUS; ANDERSSON, 1988; THAPAR et al., 2009).

Análises citológicas de medula óssea e da capa leucocitária (porção do sangue constituída por concentrados de leucócitos) são amplamente utilizadas no diagnóstico de patologias de origem neoplásica e não neoplásica e de agentes infecciosos (CHANDRA; CHANDRA, 2011). Embora a importância da utilização das amostras seja amplamente reconhecida, não existe registro da utilização de amostras de medula óssea e capa leucocitária na confecção de cito inclusão em blocos de parafina, dentre o acervo utilizado para esta pesquisa.

Em cães acometidos pela LVC, a imunocitoquímica de cito inclusões foi utilizada em células provenientes do baço a fim de avaliar a população de leucócitos no órgão em questão (BARROUIN- MELO et al., 2006).

1.7 Objetivos

- Avaliar a imunomarcção para anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3 no sangue periférico e medula óssea de cães vacinados para a Leishmaniose Visceral Canina;
- Analisar comparativamente animais vacinados, positivos e negativos para a doença;
- Propor uma padronização para a técnica de cito inclusão em parafina.

1.8 Referências

ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala-azar. VI. Canine visceral leishmaniasis. **Proceedings of the Royal Society of London B**. London, v.110, p. 402-412, 1932.

ADLER, S. Attempts to transmit Visceral Leishmaniasis to man. Remarks on the histopathology of Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 22, n. 4, p. 419-437, 1940.

ALENCAR, J.E.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In R Veronesi, **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p.706-717.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**. Madrid, v.57, p.1-88, 2004.

ARAÚJO, M.S.S.; ANDRADE, R.A.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M.C.; MELLO, M.N.; MARTINS-FILHO, O. A. Despite Leishvaccine and Leishmune® trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CT8+ T-cells support their highquality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**. Minas Gerais, v.26, n.18,p.2211-2224, 2008.

ARAÚJO, M.S.S.; ANDRADE, R.A.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M.C.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C.C.; MELLO M.N.; MARTINS-FILHO, O.A. T-cell-derived cytokines nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune®. **Vaccine**. Minas Gerais, v.27, n.7, p.1008- 1017. 2009.

ARDENGH, J.C.; LOPES, C.V.; DE LIMA, L.F.; VENCO, F.; SANTO, G.C; BEGNAMI, M; MÓDENA, J.L.P. Cell block technique and cytological smears for the differential diagnosis of pancreatic neoplasms after endosonography-guided fine-needle aspiration. **Acta Gastroenterológica Latinoamericana**. v. 38, p. 246-251, 2008.

BABIKER, Z.E.; DAVIDSON, R.; MAZINDA, C.; KIPNGETICH, S.; RITMEIJER, K. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Sudan, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.76, n.4, p. 689-693, 2007.

BARROUIN-MELO; S.M.; LARANJEIRA, D.F; SANTOS, S.O; CHAGAS-JÚNIOR, A.D; PAIXÃO, M; AGUIAR, P.H.P; SANTOS, W.L.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: Assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. **Veterinary immunology and immunopathology**. v.111, p.251-261, 2006.

BELKAID,Y.; PICCIRILLO,C.A.; MENDEZ,S.; SHEVACH,M.; SACKS, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**. v. 420, n.5, p. 502-07, 2002.

BOELAERT, M.; RIJAL, S.; REGMI, S.; SINGH, R.; KARKI, B.; JACQUET, D.; CHAPPUIS, F.; CAMPINO, L.; DESJEUX, P.; LE RAY, D.; KOIRALA, S.; VAN DER STUYFT, P. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for Visceral Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.70, n.1, p. 72-77, 2004.

BOER, O.J.; LOOS, C.M.; TEELING, P.; WAL, A.C.; TEUNISSEN, M.B.M. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 55, n.9, p.891-898, 2007.

BOGGIATTO, P.M.; GIBSON-CORLEY, K.N.; METZ, K.; GALLUP, J.M.; HOSTETTER, J.M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C.A. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. Belgium, v.5, n.4, 2011.

BORJA-CABRERA, G. P., CORREIA PONTES, N. N., SILVA, V. O., PARAGUAI DE SOUZA, E., SANTOS, W. R., GOMES, E. M., LUZ, K. G., PALATNIK, M., SOUSA, C.B.P. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**. v.20, n27-28, p.3277-3284, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde: Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. 1 ed. Brasília, DF: Editora MS. 2006.122p.

BURT, A.D.; SMILLIE, D.; COWAN, M.D. ; ADAMS, F.G. Fine needle aspiration cytology: Experience with a cell block technique. **Journal of Clinical Pathology**. v. 39, p. 114-115, 1986.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. A Leishmaniose Visceral Americana no estado de São Paulo: situação atual. **Informe mensal sobre agravos à Saúde Pública**. São Paulo, v.1, n.6, jun.2004

CARNEIRO, F.P. **Expressão de marcadores de apoptose e de Foxp3 nas diferentes formas clínicas de Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2009 (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

CHANDRA, S.; CHANDRA, H. Comparison of bone marrow aspirate cytology, touch imprint cytology and trephine biopsy for bone marrow evaluation. **Hematology Reports.** v. 3, p. 65:68, 2011.

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S.; HAILU, A.; CHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews. Microbiology.** v. 5, n.11, p. 873-882, 2007.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanism in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular pathology.** v. 72, p. 132-141, 2002.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Veterinary Parasitology.** v.141, p.1–8, 2006.

DE ALMEIDA, P.S.; MINZÃO, E.R.; MINZÃO, L.D.; DA SILVA, S.R.; FERREIRA, A.D.; FACCENDA, O.; FILHO, J.D.A. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 43, n.6, p. 723-727, 2010.

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

DUPREY, Z.H.; STEURER, F.J.; ROONEY, J.A.; KIRCHHOFF, L.V.; JACKSON, J.E.; ROWTON, E.D.; SCHANTZ, P.M. Canine Visceral Leishmaniasis, United States and Canada, 2000- 2003. **Emerging Infectious Diseases**. v.2, n.3, p.440-446, 2006.

ENGOHAN-ALOGHE, C.; HOTTAT, N. ; NOËL, J.C. Accuracy of lymph nodes cell block preparation according to ultrasound features in preoperative staging of breast cancer. **Diagnostic Cytopathology**. v. 38, p. 5-8, 2010.

EVANS, K.J; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**. v 2012, p.1-14, 2012.

FORT DODGE. **Manual técnico da Leishmune®**. São Paulo: FORT DODGE, 2004. 56p.

GIUNCHETTI, R.C; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A; CARVALHO, A.T; ROATT, B.M; SOARES, R.D.O.A; COURA-VITAL, W; ABREU, R.T; MALAQUIAS, L.C.C; GONTIJO N.F; BRODSKYN, C; OLIVEIRA C.I; COSTA D.J; LANA, M; REIS, A.B. A killed Leishmania vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine**. v.26, n. 5, p.623-628, 2008.

GOMES-PEREIRA, S.; RODRIGUES, O.R.; SANTOS-GOMES, G.M. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. **Immunology letters**. v. 95, p. 63-70, 2004.

GUARGA, J.L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA,M.J.; PERIBÁÑEZ, M.A.; ALVAR, J.; CASTILLO, J.A. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower

proportions of T helps cells. **Research in veterinary science**. v.69, n.3, p. 249-253, 2000.

GURLEY, A.M.; SILVERMAN, J.F.; LASSALETTA, M.M.; WILEY, J.E.; HOLBROOK, C.T.; JOSHI W. The utility of ancillary studies in pediatric FNA cytology. **Diagnostic Cytopathology**. v. 8, p. 137-146, 1992.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**. v. 27, n.9, p. 403-9, 2011.

HO, E.A.; SOONG, T.; LI, Y. Comparative merits of sternum, spleen and liver punctures in the study of Human Visceral Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.41, n.5, p. 629-636, 1948.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. v.65, p.37-42, 1990.

KROGERUS, L.A. ; ANDERSSON L.C. A simple method for the preparation of paraffin embedded cell blocks from fine needle aspirates, effusions and brushings. **Acta Cytologica**. Finland, v.32, p. 585-587, 1988.

KULKARNI, M.B.; DESAI, S.B; AJIT, D.; CHINOY, R.F. Utility of the thromboplastin-plasma cell-block technique for fine-needle aspiration and serous effusions. **Diagnostic Cytopathology**. v. 37, p. 85:90, 2008.

LACHI, D.R. **Leishmaniose Visceral Canina: Revisão Bibliográfica.** Monografia (Pós- Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Castelo Branco, Campo Grande, 73f., 2006.

LAINSON R, RYAN L, SHAW JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** v.82, p. 421-424, 1987.

LEZAMA-DÁVILA, C.M.; GALLAGHER,G. CD4+, CD8+ and CD4- CD8- T cell-subsets can confer protection against *Leishmania m. mexicana* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** , v.90, n.1, p.51-58, 1995.

LIMA, V.; IKEDA, F.; ROSSI, C.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R; NUNES, C; GOTO,H. Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopahtology.** v. 135, p. 296-302, 2010.

LIU,K.; DODGE,R.; GLASGOW,B.J.; LAYFIELD,L.J. Fine-needle aspiration: comparison of smear, cytospin, and cellblock preparations in diagnostic and cost effectiveness. **Diagnostic Cytopathology.** v.19,n.1, p.70-4, 1998.

MAGUILL, A.J. Epidemiology, of the leishmaniasis. **Dermatology Clinics.** v.13, n.3, p. 505-523, 1995.

MAIA,C.; CAMPINO,L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of tropical medidine,** v.2012, 7p., 2012.

MAYALL F.; CHANG B.; DARLINGTON A. A review of 50 consecutive cytology cell block preparations in a large general hospital. **Journal of Clinical Pathology**. v. 50, p. 985–990, 1997.

MILES, M.A.; VEXENANT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: **Canine Leishmaniasis: an update**. Hoechst Roussel Vet. pp. 46-53. 1999.

MOURA, E.P. **Estudo histopatológico e imunológico de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos**. Dissertação (Medicina Veterinária)- Instituto de Ciências Biológicas- ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 2007.

NAGASE, H.; JONES, K.M.; ANDERSON, C.F.; NOBEN-TRAUTH, N. Despite increased CD4+Foxp3+ cells within the infection site, BALB-c IL-4 receptor-deficient mice reveal CD4+Foxp3- negative T cells as a source of IL-10 in *Leishmania major* susceptibility. **Journal of Immunology**. v. 179, p. 2435-2444, 2010.

NATHAN N.A.; NARAYAN E.; SMITH M.M.; HORN M.J. Cell block cytology. Improved preparation and its efficacy in the diagnostic cytology. **American Journal of Clinical Pathology**. v.114, p.114:599–606, 2000.

NOGUEIRA, F.S.; MOREIRA, M.A.B; BORJA-CABRERA, G.P; SANTOS, F.N; MENZ, I; PARRA, L.E; XU, Z; CHU, H.J; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B; LUVIZOTTO, M.C.R. Leishmune® vaccine blocks transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**. v.23, n.4, p.4805-4810, 2005.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DOS SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Rio de Janeiro, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

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

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DAY, M.J. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & vectors**. v.4, n.197, 2011.

REIS, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A; GIUCHETTI, R; GUERRA, L; CARVALHO, M; MAYRINK, W; GENARO O; CORRÊA-OLIVEIRA R; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 146 ,n.2, p. 303-311, 2006.

REY,L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RODRIGUES, M.M.; BOSCARDIN, S.B.; VASCONCELOS, J.R.; HIYANE, M.I.; SALAY, G.; SOARES, I.S. Importance of CD8+ T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 75, n.4, p.443-468, 2003.

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

ROHTAGI,S.K.; AGARWAL,M.; BOSE,D.; CHATTOPADHYA,K.; SAHA,K. Blood, bone marrow and splenic lymphocyte subset profiles in Indian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 90, p. 431-434, 1996.

ROSA,R.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O.R.; SANTOS-GOMES, G.M. *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4+ and CD8+ T cells. **Acta tropica**, v.97, p.309-317, 2006.

ROSS, R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**. v.2, p.1261-2, 1903.

SARAIVA, E.M; BARBOSA, A.F; SANTOS, F.N; BORJA-CABRERA, G.P; NICO, D; SOUZA, L.O.P; MENDES-AGUIAR C.O; SOUZA, E.P; FAMPA, P; PARRA, L.E; MENZ, I; DIAS JR, J.G; OLIVEIRA, S.M; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. The FMLvaccine (Leishmune®) against canine visceral leishmaniasis: A transmission blocking vaccine. **Vaccine**. v.24, p.2423-2431, 2006.

SHARMA,U.; SINGH,S. Immunobiology of Leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 47. p. 412-423, 2009.

SIDDIG, M.; GHALIB, H.; SHILLINGTON, D.C.; PETERSEN, E.A. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v.82, n.1, p. 66-68, 1988.

SILVA, F.L.; OLIVEIRA, R.G.; SILVA, T.M.A.; XAVIER, M.N.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology.** v.160, p. 55-59, 2009.

SMITH, L.F.; RODRIGUES, M.; RUSSELL, D.G. The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and Leishmania-infected macrophages. **Journal of experimental medicine.** v. 174, p. 499-505, 1991.

SUCEN; CCD. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana no estado de São Paulo.** São Paulo: A Secretaria, 2006. 160p.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.** v.9, n.5, p. 951-958, 2002.

THAPAR, M.; MISHRA, R.K.; SHARMA, A.; GOYAL, V. ; GOYAL V. Critical analysis of cell block versus smear examination in effusions. **Journal of Cytology.** v. 26, p. 60-64, 2009.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 52, n.3, p. 287-292, 1995.

TZAGOZIS,P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology international,** v.54, p. 139-146, 2005.

VARSEGI,G.; SHIDHAM,V. Cell block preparation from cytology specimen with predominance of individually scattered cells. **Journal of Visualized Experiments**. n.29, p. 1-7, 2009.

WITT, C.J.; RICHARDS, A.L.; MASUOKA, P.M.; FOLEY, D.H.; BUCZAK, A.L.; MUSILA, L.A.; RICHARDSON, J.H.; COLACICCO-MAYHUGH, M.G.; RUEDA, L.M.; KLEIN, T.A.; ANYAMBA, A.; SMALL, J.; PAVLIN, J.A.; FUKUDA, M.M.; GAYDOS, J.; RUSSELL, K.L.; THE AFHSC-GEIS PRACTICE SURVEILLANCE WHITING GROUP. The AFHSC-Division of GEIS Operations Predictive Surveillance Program: a multidisciplinary approach for the early detection and response to disease outbreaks. **BMC Public Health**. v.11, p.1-16, 2011.

ZIJLSTRA, E.E.; ALI, M.S.; EL-HASSAN, A.M.; TOUM, I.A.; SATTI, M.; GHALIB, H.W.; KAGER, P.A. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.86, n.5, p. 505-507, 1992.

CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA DE CÃES VACINADOS PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

IMMUNOCYTOCHEMICAL EVALUATION OF CELLULAR IMMUNE RESPONSE FROM PERIPHERAL BLOOD AND BONE MARROW IN DOGS IMMUNIZED FOR CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

Milla Bezerra Paiva^{*1}, Gabriela Mayumi Gouveia¹, Heitor Flávio Ferrari¹, Carlos Eduardo Fonseca Alves², Reneé Laufer Amorim³, Silvia Helena Venturoli Perri⁴, Maria Cecília Rui Luvizotto⁴

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi analisar a resposta imune celular de cães negativos (GI), vacinados (GII) e positivos (GIII) para a LVC por meio da imunocitoquímica para os anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3 na capa leucocitária e medula óssea. Na capa leucocitária, quando comparados os grupos entre si, não houve diferença estatística para as células T CD4. Os grupos I e III apresentaram maior imunomarcagem para anti-CD8. Embora não tenha sido observada diferença estatística ($p > 0,05$), a imunomarcagem para FOXP3 mostrou os menores valores percentuais nos três grupos estudados. Os grupos I e II apresentaram maior imunomarcagem para anti-CD4, seguida do anti-CD8, quando comparados os 3 anticorpos em cada grupo. Nos animais do

* Bolsista FAPESP (Processo: 2009/12895-7).

¹ Médico Veterinário, pós graduando em Ciência Animal pela UNESP- campus Araçatuba. Rua Clóvis Pestana, 793-Araçatuba-SP 16050-680. E-mail: millabpaiva@gmail.com

² Médico Veterinário, pós-graduando em Medicina Veterinária pela UNESP- Campus Botucatu. Distrito de Rubião Junior, s/n. CEP:18618-970 - Botucatu, SP.

³ Médica Veterinária, *PhD*, Docente da UNESP- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Distrito de Rubião Junior, s/n. CEP:18618-970 - Botucatu, SP.

⁴ Médica Veterinária, *PhD*, Docente da UNESP- Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Rua Clóvis Pestana, 793-Araçatuba-SP 16050-680. E-mail: ruimcl@fmva.unesp.br

grupo III, foi observada maior expressão de células imunorreativas ao anti-CD8 seguida do anti-CD4, e valores reduzidos para FOXP3. Nas células da medula óssea não foi verificada diferença estatística na expressão dos anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3 nos três grupos estudados. Na análise comparativa entre os anticorpos testados, entretanto, foi observada maior marcação para o anticorpo anti-CD4 em GI, ausência de diferença estatística em GII e maior percentual de células positivas para anti-CD8 em GIII. Os valores de FOXP3 também se mantiveram reduzidos em todos os grupos. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a presença de células T CD4+ e CD8+ em animais vacinados, em associação à expressão reduzida do marcador de células T regulatórias FOXP3, sugerem que a vacina Leishmune[®] exerce um efeito estimulatório na resposta imune celular de cães, promovendo um incremento da resposta protetora Th1.

Palavras-chave: cão, Leishmania, linfócito, medula óssea, sangue periférico, imunocitoquímica.

ABSTRACT

The aim of this research was to analyze the cellular immune response of negative (GI), vaccinated (GII) and positive (GIII) dogs for VCL by immunocytochemistry for CD4, CD8 and FOXP3 antibodies on the buffy coat and bone marrow. In the buffy coat, when compared the three groups together, there was no statistical difference in CD4+ T cells. Groups I and III showed higher immunostaining for anti-CD8. Although no statistical difference was observed, immunostaining for FOXP3 showed the lowest percentages in all three groups. Groups I and II showed higher immunoreactivity to anti-CD4 followed by anti-CD8 antibodies in each group separately. In group III, we observed increased expression of immunoreactive cells to anti-CD8 followed by anti-CD4, and reduced values for FOXP3. In bone marrow cells there was no statistical difference in the expression of anti-CD4, anti-CD8 and FOXP3

antibodies in the three groups. The comparative analysis between the antibodies tested, however, revealed greater cellularity expressing anti-CD4 in GI, no statistical difference in GII and increase in anti-CD8 positive cells in GIII. FOXP3 values also remained low in all groups. The results of this study indicate that the presence of CD4 + and CD8 + T lymphocytes in the vaccinated animals, combined with reduced expression of the marker of regulatory T cells FOXP3 suggest that Leishmune ® vaccine exerts a stimulatory effect on immune response of dogs, promoting an increase in the protective Th1 response.

Keywords: canine, Leishmania, lymphocyte, bone marrow, peripheral blood, immunocytochemistry.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é considerada endêmica em diversos países incluindo o Brasil e possui como reservatório principal o cão doméstico (BRASIL, 2006; DEANE; DEANE, 1962).

Estudos sobre a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) apontam os linfócitos T CD4+ e CD8+ como células que desempenham papel fundamental na resposta imune celular por meio da produção de citocinas indutoras da resposta Th1, propiciando imunidade protetora aos animais infectados (GOMES-PEREIRA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2003; SMITH et al., 1991; TSAGOZIS et al., 2005). Em contrapartida, modelos experimentais associam a suscetibilidade frente à infecção pela *Leishmania* spp. às células T regulatórias, relacionadas com a inibição na produção de citocinas importantes para a resistência do hospedeiro ao parasito (BELKAID et al., 2002; NAGASE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2009; SHARMA; SINGH, 2009).

Embora a vacina contra LVC seja uma importante arma no controle da doença em cães, a resposta imune celular em animais vacinados ainda não

está totalmente esclarecida (ARAÚJO et al., 2008; ARAÚJO et al., 2009; BORJA-CABRERA et al., 2002; DANTAS- TORRES, 2006; GIUNCHETTI et al., 2008; LIMA et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2005; SARAIVA et al., 2006).

O objetivo dessa pesquisa foi analisar a resposta imune celular de cães negativos, vacinados (Leishmune[®]) e positivos para a LVC (GI, GII e GIII, respectivamente) por meio da imunocitoquímica para os anticorpos anti-CD4, anti- CD8 e FOXP3 nas células da capa leucocitária e da medula óssea.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Cães (n=84) provenientes da cidade de Andradina-SP foram utilizados neste estudo, todos com o consentimento prévio dos respectivos proprietários e escolhidos randomicamente sem distinção de raça, idade ou sexo. Foram definidos três grupos distintos para a realização do experimento: o Grupo (G) I composto por 23 animais negativos para a LVC e não vacinados; o Grupo (G) II compreendendo 41 animais negativos vacinados (Leishmune[®]) e o Grupo (G) III composto por 20 animais positivos para LVC. O diagnóstico negativo e positivo para a doença foi realizado por meio de ELISA e reação de imunofluorescência indireta (TECSA laboratórios) e análise citológica das amostras de medula óssea.

Cito inclusão

Foram preparadas cito inclusões em parafina dos aspirados de medula óssea e da capa leucocitária (separada mecanicamente do sangue periférico), por meio de centrifugação (centrífuga Excelsa da FANEM[®], modelo 206BL) a 2000 rpm por 5 minutos para a formação do agregado celular. As amostras foram então fixadas por 24-48 horas em álcool a 95% e em seguida clivadas longitudinalmente e inseridas em cassetes histológicos. Foram então submetidas ao processamento histológico de rotina com modificação dos

tempos para 20 minutos em cada álcool absoluto, xilol e parafina (3 cubas cada).

Imunocitoquímica

Das amostras incluídas em parafina foram obtidos cortes de 3 µm de espessura, aderidos em lâminas com extremidade fosca, tratadas com Poli-L-Lisina (SIGMA-ALDRICH™) destinadas à reação de imunocitoquímica.

As lâminas contendo as amostras foram submetidas à desparafinização e hidratação, recuperação antigênica pelo calor, bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio das ligações inespecíficas e incubação com os anticorpos primários (Tabela 1). Após esta etapa, foi utilizado o protocolo padrão para o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB, Dako) revelação com o cromógeno DAB (Gibco®) e contra-coloração com Hematoxilina de Harris.

Para a avaliação da imunomarcagem das amostras da capa leucocitária foi utilizada análise semi-quantitativa, realizada por meio de escores: ausência de células imunomarcadas (escore 0), de 1% a 7% de células imunomarcadas (escore 1), 8% a 15% (escore 2) e acima de 15% (escore 3). Para a medula óssea os escores variaram entre: ausência de células imunomarcadas (escore 0), de 1% a 3% de células imunomarcadas (escore 1), 4% a 6% (escore 2) e acima de 6% (escore 3). A análise semi-quantitativa foi realizada em microscópio óptico Olympus modelo BX51 em 10 campos, utilizando-se a objetiva de 100 X em imersão.

Tabela 1- Anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição
CD4	SP35	Cell Marque	1:100
CD8	C8/144B	Cell Marque	1:50
FOXP3		Everest Biotech	1:2000

Análise estatística

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado aos valores dos escores da reação de imunocitoquímica da capa leucocitária do sangue periférico, realizando-se a comparação entre os grupos para cada anticorpo testado. Para comparar a expressão positiva dos anticorpos em cada grupo foi usado o teste de Friedman e para as comparações múltiplas o de Dunn.

O resultado estatístico foi considerado significativo quando $p < 0,05$. Foi utilizado o programa SAS (Statistical Analysis System) para as análises.

RESULTADOS

Durante a realização das técnicas de cito inclusão e imunocitoquímica, foram recuperadas amostras cujo total para cada grupo encontra-se expresso nas Tabelas 2 e 3.

A expressão do anticorpo anti-CD4 (Figura 1A) nas células da capa leucocitária do sangue periférico não mostrou diferença estatística nos grupos estudados (Tabela 2).

Na análise da capa leucocitária, Grupos I e III apresentaram percentual maior de células reagentes ao anticorpo anti-CD8 (Figura 1B), quando comparados ao Grupo II. Embora não tenha sido observada diferença estatística ($p > 0,05$), a imunomarcagem para FOXP3 mostrou os menores valores percentuais nos três grupos estudados. A análise comparativa da imunomarcagem positiva dos anticorpos para CD4, CD8 e FOXP3 em cada grupo separadamente, revelou que os Grupos I e II apresentaram maior imunomarcagem para anti-CD4, seguida do anti-CD8. Os valores da marcação para FOXP3 se mantiveram reduzidos em ambos os grupos. Nos animais do Grupo III, foi observada maior expressão de células imunorreativas ao anti-CD8 seguida do anti-CD4, e valores reduzidos para FOXP3.

Tabela 2- Percentual de imunomarcção dos anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3 na capa leucocitária dos grupos de animais negativos (GI), vacinados (GII) e positivos (GIII) para a LVC.

Grupo	Escore	Anticorpo						P ⁽¹⁾
		CD4		CD8		FOXP3		
		n	%	n	%	n	%	
GI	0	-	-	-	-	4	19,1	0,0001
	1	8	40,0	5	26,3	15	71,4	
	2	4	20,0	8	42,1	2	9,5	
	3	8	40,0	6	31,6	-	-	
	Total	20	100,0	19	100,0	21	100,0	
GII	0	3	13,6	1	3,7	15	51,7	0,0003
	1	7	31,8	17	63,0	13	44,8	
	2	9	41,0	7	25,9	1	3,5	
	3	3	13,6	2	7,4	-	-	
	Total	22	100,0	27	100,0	29	100,0	
GIII	0	-	-	-	-	5	31,2	0,0002
	1	6	40,0	4	28,6	11	68,8	
	2	7	46,7	7	50,0	-	-	
	3	2	13,3	3	21,4	-	-	
	Total	15	100,0	14	100,0	16	100,0	
P⁽²⁾		0,3387		0,0067		0,0506		

⁽¹⁾ teste de Friedman

⁽²⁾ teste de Kruskal-Wallis

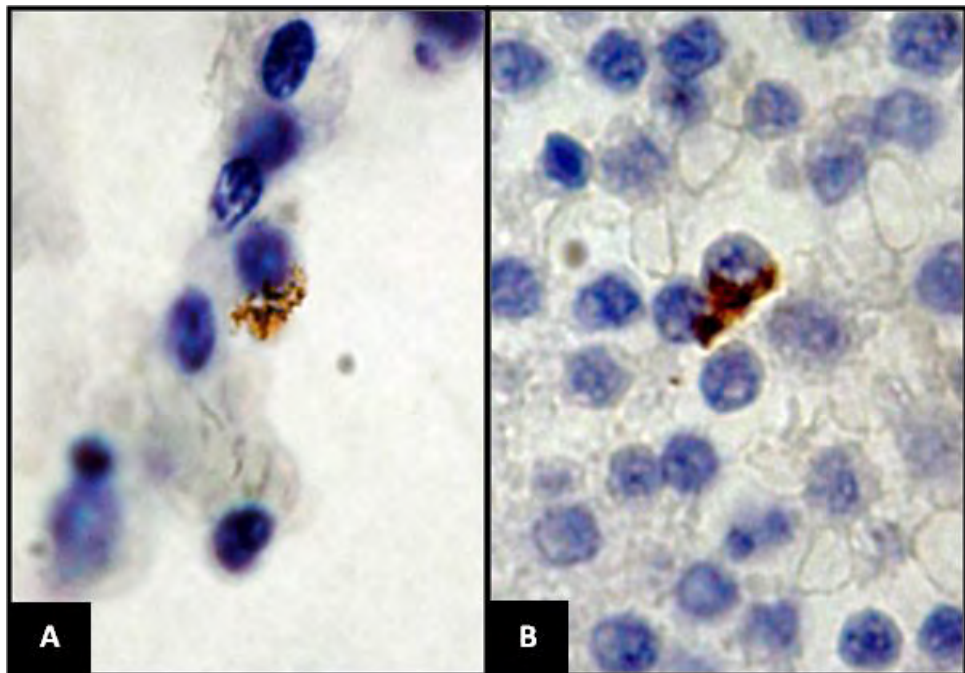


Figura 1- Reação de imunocitoquímica para os anticorpos anti-CD4 (A) e anti-CD8 (B) em amostra de capa leucocitária. Objetiva de imersão.

Nas células da medula óssea (Tabela 3) não foi verificada diferença estatística na expressão dos anticorpos anti-CD4, anti-CD8 (Figura 2) e FOXP3 nos três grupos estudados. Na análise comparativa entre a imunorreação aos anticorpos testados, entretanto, foi observada maior celularidade expressando anti-CD4 GI, ausência de diferença estatística em GII e maior percentual de células positivas para anti-CD8 em GIII. Os valores de FOXP3 também se mantiveram reduzidos em todos os grupos.

Tabela 3- Percentual de células positivas para os anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e FOXP3 na medula óssea dos grupos de animais negativos (GI), vacinados (GII) e positivos (GIII) para a LVC.

Grupo	Escore	Anticorpo						P ⁽¹⁾
		CD4		CD8		FOXP3		
		n	%	n	%	n	%	
GI	0	1	20,0	-	-	2	40,0	0,0469
	1	-	-	2	40,0	3	60,0	
	2	2	40,0	3	60,0	-	-	
	3	2	40,0	-	-	-	-	
	Total	5	100,0	5	100,0	5	100,0	
GII	0	-	-	-	-	4	40,0	0,3679
	1	4	80,0	2	25,0	5	50,0	
	2	1	20,0	3	37,5	-	-	
	3	-	-	3	37,5	1	10,0	
	Total	5	100,0	8	100,0	10	100,0	
GIII	0	-	-	-	-	5	38,5	0,0003
	1	6	50,0	4	33,3	7	53,8	
	2	2	16,7	5	41,7	-	-	
	3	4	33,3	3	25,0	1	7,7	
	Total	12	100,0	12	100,0	13	100,0	
P⁽²⁾		0,3063		0,4989		0,9724		

⁽¹⁾ teste de Friedman

⁽²⁾ teste de Kruskal-Wallis

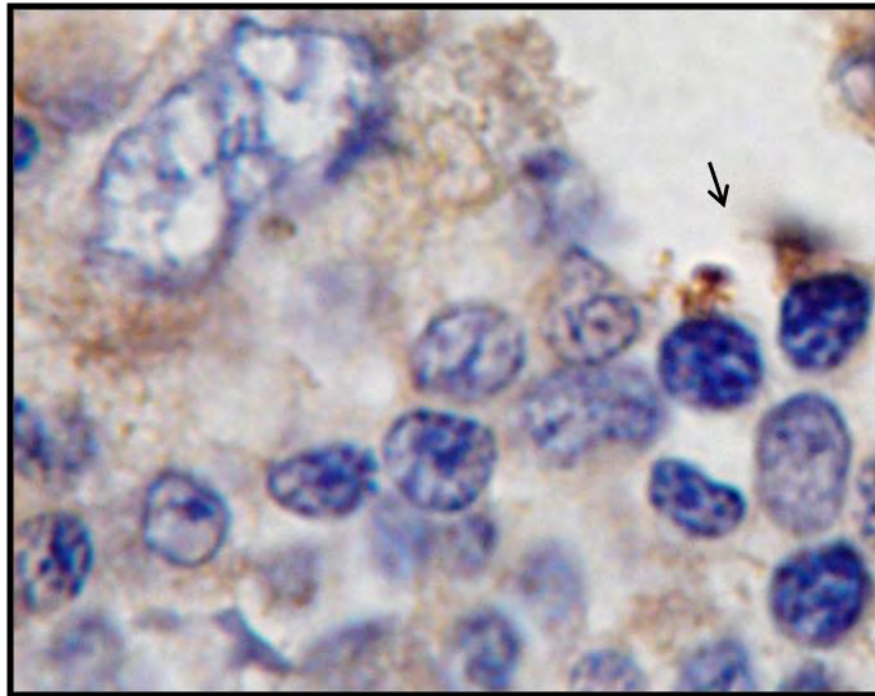


Figura 2. Reação de imunocitoquímica para o anticorpo anti-CD8 na medula óssea. Objetiva de imersão. As células imunomarcadas estão indicadas por seta.

DISCUSSÃO

A ausência de diferença significativa entre os grupos para o marcador anti- CD4 nas células da capa leucocitária do sangue periférico corrobora com a expressão deste marcador em modelo experimental murino em células esplênicas, visto que também não foram observadas diferenças significativas no cultivo *in vitro* deste subtipo celular (GOMES- PEREIRA et al., 2004). Ramos et al. (2008) também não observaram diferença no percentual de linfócitos T CD4+ em cães vacinados, não vacinados e positivos para leishmaniose visceral, utilizando uma vacina DNA recombinante do antígeno LACK do parasito.

A imunomarcção para anti-CD8 foi expressiva nos animais negativos não vacinados, sugerindo que as células T CD8+ participam no mecanismo de resistência à infecção por *Leishmania* spp. juntamente com os linfócitos T CD4+ (GOMES-PEREIRA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2003; SMITH et al., 1991; TSAGOZIS et al., 2005). O grupo III também apresentou maior expressão de células CD8+ quando comparado aos demais grupos, o que de acordo com Reis et al. (2006), pode estar relacionado ao número maior de cães assintomáticos no grupo de animais positivos aqui estudados.

A resposta imune celular de linfócitos T CD4+ e CD8+ em cães vacinados para a LVC, especificamente com a vacina Leishmune[®], é caracterizada por valores superiores de células T CD8+ (ARAÚJO et al., 2008). Na análise dos resultados referentes à capa leucocitária, porém, os valores foram maiores de linfócitos T CD4+ em relação aos CD8+ em animais negativos (GI) e nos vacinados (GII). Este resultado concorda com Borja-Cabrera et al. (2004) e Santos et al.(2007), que observaram valores superiores de linfócitos T CD4+ em cães vacinados. O maior percentual de linfócitos T CD4+ observado nos animais negativos não vacinados (GI) reforça a existência de imunidade protetora, mesmo que transitória, devido à participação ativa deste subtipo celular na produção de citocinas como o IFN- γ , uma importante citocina envolvida na resposta do tipo Th1. A imunomarcção acentuada para anti-CD8 comparada com os outros anticorpos está associada provavelmente à presença expressiva de animais assintomáticos no grupo estudado (GUARGA et al., 2000; ROSA et al., 2006)

Na análise da expressão dos imunomarcadores na medula óssea, a ausência de diferença estatística entre os grupos estudados provavelmente reside no fato de que esse compartimento celular possui número reduzido de linfócitos T diferenciados dificultando a análise comparativa (JAIN, 1993). Outra hipótese a ser considerada é a falta de relação entre o controle da infecção e a proliferação destes subtipos celulares na medula óssea (MAIA; CAMPINO, 2012). O percentual maior de células T CD4+ em GI sugere, semelhante à capa leucocitária, a evidência de imunidade protetora. A maior

imunomarcção para CD8 frente aos demais anticorpos testados no grupo de cães vacinados pode demonstrar a participação deste subtipo celular nos estágios iniciais da infecção, visto que a vacina é constituída por subunidades de antígenos do parasito (TSAGOZIS et al., 2005). Os resultados demonstram semelhança aos verificados na capa leucocitária do sangue periférico, que sugerem o predomínio de animais positivos assintomáticos neste grupo estudado.

Embora a função das células T regulatórias ainda não esteja totalmente compreendida em cães vacinados para a doença, Carrión et al. (2008) sugerem que a redução dessa população celular em órgãos linfóides secundários possa indicar êxito na vacinação para a leishmaniose em modelo experimental murino. Recentemente Lima et al. (2010) analisaram a população de células T regulatórias na capa leucocitária de cães vacinados para a LVC por meio de citometria de fluxo, verificando redução dessas células após a imunização. A expressão de FOXP3 não apresentou diferença significativa entre os grupos deste estudo, comportamento similar ao observado por Carneiro (2009) ao avaliar as células T regulatórias na leishmaniose tegumentar humana. A imunomarcção celular reduzida para FOXP3 sugere o predomínio da resposta Th1 na maioria das amostras caninas analisadas, visto que as células T regulatórias são responsáveis pelo aumento na produção de IL-10, relacionada à resposta Th2 e inibição na produção de IFN- γ e IL-12, citocinas estas importantes para a resposta protetora Th1 (CUNNINGHAM, 2002; NAGASE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2009; SHARMA; SINGH, 2009).

CONCLUSÃO

Nesse estudo, a expressão de marcadores celulares em cães vacinados para LVC revelaram predomínio da resposta imune protetora, particularmente no sangue periférico.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, M.S.S.; ANDRADE, R.A.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M.C.; MELLO, M.N.; MARTINS-FILHO, O. A. Despite Leishvaccine and Leishmune® trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CT8+ T-cells support their highquality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**. Minas Gerais, v.26, n.18,p.2211-2224, 2008.

ARAÚJO, M.S.S.; ANDRADE, R.A.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M.C.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C.C.; MELLO M.N.; MARTINS-FILHO, O.A. T-cell-derived cytokines nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune®. **Vaccine**. Minas Gerais, v.27, n.7, p.1008- 1017. 2009.

BELKAID,Y.; PICCIRILLO,C.A.; MENDEZ,S.; SHEVACH,M.; SACKS, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**. v. 420, n.5, p. 502-07, 2002.

BORJA-CABRERA, G. P., CORREIA PONTES, N. N., SILVA, V. O., PARAGUAI DE SOUZA, E., SANTOS, W. R., GOMES, E. M., LUZ, K. G., PALATNIK, M., SOUSA, C.B.P. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**. v.20, n27-28, p.3277-3284, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde: Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. 1º Ed. Brasília, DF: Editora MS. 2006.122p.

CARNEIRO, F.P. **Expressão de marcadores de apoptose e de Foxp3 nas diferentes formas clínicas de Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2009 (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Disponível em
<http://bdtd.bce.unb.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=5433>

CARRIÓN, J., FOLGUEIRA, C., ALONSO, C. Transitory or long-lasting immunity to *Leishmania major* infection: the result of immunogenicity and multicomponent properties of histone DNA vaccines. **Vaccine.** v. 26, p. 1155-65, 2008.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanism in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular pathology.** v. 72, p. 132-141, 2002.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Veterinary Parasitology.** v.141, p.1–8, 2006.

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

GIUNCHETTI, R.C; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A; CARVALHO, A.T; ROATT, B.M; SOARES, R.D.O.A; COURA-VITAL, W; ABREU, R.T; MALAQUIAS, L.C.C; GONTIJO N.F; BRODSKYN, C; OLIVEIRA C.I; COSTA D.J; LANA, M; REIS, A.B. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine.** v.26, n. 5, p.623-628, 2008.

GOMES-PEREIRA, S.; RODRIGUES, O.R.; SANTOS-GOMES, G.M. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. **Immunology letters**. v. 95, p. 63-70, 2004.

GUARGA, J.L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA,M.J.; PERIBÁÑEZ, M.A.; ALVAR, J.; CASTILLO, J.A. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helps cells. **Research in veterinary science**. v.69, n.3, p. 249-253, 2000.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. 1. ed. Malvern, Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993.

LIMA, V.; IKEDA, F.; ROSSI, C.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R; NUNES, C; GOTO,H. Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopahtology**. v. 135, p. 296-302, 2010.

MAIA,C.; CAMPINO,L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of tropical medidine**, v.2012, 7p., 2012.

NAGASE, H.; JONES, K.M.; ANDERSON, C.F.; NOBEN-TRAUTH, N. Despite increased CD4+Foxp3+ cells within the infection site, BALB-c IL-4 receptor-deficient mice reveal CD4+Foxp3- negative T cells as a source of IL-10 in *Leishmania major* susceptibility. **Journal of Immunology**. v. 179, p. 2435-2444, 2010.

NOGUEIRA, F.S.; MOREIRA, M.A.B; BORJA-CABRERA, G.P; SANTOS, F.N; MENZ, I; PARRA, L.E; XU, Z; CHU, H.J; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B;

LUVIZOTTO, M.C.R. Leishmune® vaccine blocks transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**. v.23, n.4, p.4805-4810, 2005.

RAMOS, I.; ALONSO, J.M.; PERIS, A.; CASTILLO, J.A.; COLMENARES, M.; LARRAGA, V. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. **Vaccine**. v. 26, p. 333-344, 2008.

REIS, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A; GIUCHETTI, R; GUERRA, L; CARVALHO, M; MAYRINK, W; GENARO O; CORRÊA-OLIVEIRA R; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 146 ,n.2, p. 303-311, 2006.

RODRIGUES, M.M.; BOSCARDIN, S.B.; VASCONCELOS, J.R.; HIYANE, M.I.; SALAY, G.; SOARES, I.S. Importance of CD8+ T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 75, n.4, p.443-468, 2003.

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

ROSA,R.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O.R.; SANTOS-GOMES, G.M. *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine

expression and production patterns by CD4+ and CD8+ T cells. **Acta tropica**, v.97, p.309-317, 2006.

SANTOS, F.N., BORJA-CABRERA, G.P. MIYASHIRO, L.M., GRECHI, J., REIS, A. B., MOREIRA, M.A., MARTINS FILHO, O.A., LUVIZOTTO, M.C., MENZ, I., PESSOA, L.M., GONCALVES, P. R., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. **Vaccine**. v. 25, p. 6176–6190, 2007.

SARAIVA, E.M; BARBOSA, A.F; SANTOS, F.N; BORJA-CABRERA, G.P; NICO, D; SOUZA, L.O.P; MENDES-AGUIAR C.O; SOUZA, E.P; FAMPA, P; PARRA, L.E; MENZ, I; DIAS JR, J.G; OLIVEIRA, S.M; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. The FMLvaccine (Leishmune®) against canine visceral leishmaniasis: A transmission blocking vaccine. **Vaccine**. v.24, p.2423-2431, 2006.

SAS INSTITUTE INC. **The SAS System, release 9.2**. SAS Institute Inc., Cary:NC, 2008.

SHARMA,U.; SINGH,S. Immunobiology of Leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 47. p. 412-423, 2009.

SMITH, L.F.; RODRIGUES, M.; RUSSELL, D.G. The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and Leishmania-infected macrophages. **Journal of experimental medicine**. v. 174, p. 499-505, 1991.

TZAGOZIS,P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology international**, v.54, p. 139-146, 2005.

CAPÍTULO 3- CITO INCLUSÃO DE CAPA LEUCOCITÁRIA E MEDULA ÓSSEA DE CÃES: PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

CELL BLOCK OF CANINE BUFFY COAT AND BONE MARROW IN PARAFFIN BLOCKS: TECHNIQUE STANDARDIZATION

Milla Bezerra Paiva¹, Gabriela Mayumi Gouveia¹, Heitor Fioravanti² e Maria Cecília Rui Luvizotto³

RESUMO

A técnica de cito inclusão é amplamente utilizada e reconhecida por profissionais da área da saúde, em particular médicos patologistas, porém as informações sobre a aplicação deste método em Medicina Veterinária ainda são raras. Análises citológicas de medula óssea e da capa leucocitária (porção do sangue formada por concentrados de leucócitos) são amplamente utilizadas no diagnóstico de patologias de origem neoplásica e não neoplásica e de agentes infecciosos. Embora a importância do uso da técnica seja amplamente reconhecida, não há registro da utilização de amostras citológicas de medula óssea e capa leucocitária na confecção de cito inclusões em blocos de parafina, como meio de diagnóstico no segmento médico veterinário. Assim, este trabalho tem como objetivo elaborar um protocolo de cito inclusão em parafina para amostras citológicas de medula óssea e capa leucocitária de cães. Foram submetidas à técnica de cito inclusão 110 amostras de capa leucocitária e 44 de medula óssea de cães portadores ou não de enfermidade sistêmica, sendo que em 68 % destas, tanto para a capa leucocitária, quanto para a medula óssea as amostras se mostraram viáveis. A utilização do álcool

¹ Médico Veterinário, pós-graduando em Ciência Animal pela UNESP- campus Araçatuba. Rua Clóvis Pestana, 793-Araçatuba-SP 16050-680. E-mail: millabpaiva@gmail.com

² Graduando em Medicina Veterinária pela UNESP-campus Araçatuba. Rua Clóvis Pestana, 793-Araçatuba-SP 16050-680.

³ Professora Assistente Doutora da UNESP- campus Araçatuba. Rua Clóvis Pestana, 793-Araçatuba-SP 16050-680. E-mail: ruimcl@fmva.unesp.br

95% como fixador e de etapas no processamento histológico de 20 minutos (álcool absoluto, xilol e parafina, 3 banhos cada) foi crucial para a qualidade dos cortes histológicos e análise microscópica dos espécimes corados pela hematoxilina-eosina. A separação mecânica da capa leucocitária e a centrifugação do aspirado de medula óssea foram eficientes e de baixo custo no preparo das cito inclusões. Ressalta-se a importância na padronização da técnica de cito inclusão, em particular para amostras de capa leucocitária e medula óssea, visando à obtenção de espécimes de qualidade independente das limitações de equipamentos.

Palavras-chave: cito inclusão, capa leucocitária, medula óssea, técnica, cão.

ABSTRACT

The cell block technique is widely used and recognized by health professional, but lacks in information about the specific contribution of this method in veterinary medicine. Cytology of bone marrow and buffy coat (cellular portion of the whole blood) are widely used in the diagnostic of neoplastic and non neoplastic diseases, and also for detection of infectious agents. Although the importance of these samples is widely recognized, there is no information about the use of buffy coat and bone marrow samples in the cell block procedure among the research material used for this paper. This work aims the cell block standardization for canine buffy coat and bone marrow samples. We collected 110 buffy coat samples and 44 bone marrow samples for the cell block preparation, and 68,2% of buffy coat and the same for the bone marrow proved to be viable at the end of the procedure. The 95% ethanol fixatives along with the 20 minute processing steps (absolute ethanol, xilol and paraffin, 3 of each) were crucial to the quality of the material both in microtomy and optical microscopy. Mechanical separation of the buffy coat proved to be easy and cheap and so was used to compose the cell block technique. In this research, we emphasized the importance of cell block standardization in order to develop

and easy, inexpensive and reproducible method, independently of any limitations of each professional.

Keywords: cell block, buffy coat, bone marrow, technique, dog.

INTRODUÇÃO

A cito inclusão compreende o ato de inserir amostras citológicas em blocos de parafina com a finalidade de auxiliar na qualidade do diagnóstico citológico e também de se obter espécimes de reserva para serem utilizados nas técnicas diagnósticas complementares, como a imuno-histoquímica e imunocitoquímica (ARDENGH et al. 2008; BALES; DURFEE, 1992; KEYHANI-RAFAGAS et al., 1984; LIU et al.,1998; MAYALL et al.,1997; SHIGHAM,2009; VARSEGI).

A técnica de cito inclusão, amplamente utilizada e reconhecida por profissionais da área da saúde, possui um número reduzido de informações sobre a contribuição específica deste método com vistas ao diagnóstico em Medicina Veterinária.

Em virtude da grande variabilidade de técnicas testadas e utilizadas na confecção de cito inclusões, a comparação entre as mesmas torna-se inviável, gerando grandes dificuldades na padronização de um método universal para esta modalidade de processamento e armazenamento de material destinado ao exame citológico (NATHAN et al., 2000; NIGRO et al., 2007; SHIVAKUMARSWAMY *et al.*, 2012). Somado a este aspecto, existem as variáveis da adaptação da técnica para diferentes laboratórios, que dependem da estrutura física, parque de equipamentos, finalidade, material e investimento disponível para a execução dos procedimentos (GURLEY et al., 1992; NATHAN et al., 2000).

O desenvolvimento e padronização da técnica de cito inclusão devem atender aos seguintes requisitos: manutenção da morfologia celular e

arquitetura tecidual; otimização do tempo de processamento das amostras sem perda de qualidade do material; obtenção de material de reserva suficiente para a realização de testes como colorações especiais e reações de imuno-histoquímica; e por fim, desenvolvimento de método simples, de custo reduzido e reprodutível (BURT et al., 1986; NATHAN et al., 2000; KULKARNI et al., 2008).

Um dos pontos mais importantes da técnica reside na possibilidade de perda do material durante o processamento. Adaptações e modificações na técnica foram aplicadas como o uso de ágar ou plasma/tromboplastina para agregação do sedimento celular, porém estes métodos também possuem desvantagens e em determinadas situações não são recomendados (KUNG et al., 1989).

Visando a maximização da utilidade das cito inclusões, as técnicas de fixação e processamento de amostras devem ser modificadas para que haja um aumento na sensibilidade dos diagnósticos citológicos e maior qualidade nas técnicas complementares, como a imuno-histoquímica (GANGANE et al., 2007; KROGEROUS; ANDERSSON, 1988; KUNG et al., 1989).

Dentre os fluidos utilizados na técnica de cito inclusão estão as efusões, as punções aspirativas por agulha fina (PAAF) de nódulos e/ou órgãos, secreções lavados vesicais e prostáticos (CHANDRA; CHANDRA, 2011; ENGOHAN-ALOGHE et al., 2010; KROGERUS; ANDERSSON, 1988; THAPAR et al., 2009).

Análises citológicas de medula óssea e da capa leucocitária (porção do sangue constituída por concentrados de leucócitos) são amplamente utilizadas no diagnóstico de patologias de origem neoplásica e não neoplásica e de agentes infecciosos (CHANDRA; CHANDRA, 2011). Embora a importância da utilização das amostras seja amplamente reconhecida, não existe registro da utilização de amostras de medula óssea e capa leucocitária na confecção de cito inclusão em blocos de parafina, dentre o acervo utilizado para esta pesquisa.

Este trabalho tem como objetivo a padronização da técnica de cito inclusão, incluindo os processos de fixação, desidratação, diafanização e inclusão em parafina para amostras citológicas de medula óssea e capa leucocitária de cães portadores ou não de enfermidade sistêmica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 110 amostras de sangue periférico e 44 de medula óssea de cães para a confecção das cito inclusões, todas coletadas com o consentimento prévio dos proprietários.

O sangue periférico foi coletado por venopunção da cefálica em cães de médio e grande porte e da veia jugular em animais de pequeno porte e filhotes. Para o procedimento, foram utilizadas seringas de 5 ou 10 mL, agulhas de 22G e 29G e tubos contendo anticoagulante (EDTA).

Para a medula óssea, a coleta foi no esterno, realizando previamente um botão anestésico com cloridrato de lidocaína a 2%. Com o auxílio de agulhas de Rosenthal em animais de médio e grande porte e agulhas 40mm x 12mm em animais de pequeno porte e filhotes e seringa de 20 mL.

Para a obtenção da capa leucocitária do sangue periférico as amostras foram centrifugadas (centrífuga Excelsa da FANEM[®], modelo 206BL) a 2000 rpm por 5 minutos. Após a retirada do plasma com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a capa leucocitária foi removida do tubo com o auxílio de uma pipeta de 10 microlitros e inserida em tubos de 1,5 mL contendo álcool a 95%, sendo novamente centrifugada na mesma velocidade e tempo para a formação do agregado celular, ou “pellet” e troca do fixador. O aspirado de medula óssea também foi depositado em tubos de 1,5 mL contendo álcool a 95% e submetido a processo de centrifugação como acima descrito, para a formação do agregado celular.

Após 24 a 48 horas de fixação, os agregados celulares foram retirados dos tubos, clivados longitudinalmente e inseridos em cassetes histológicos que

foram submetidos a banhos crescentes de álcool, seguindo para os banhos de xilol e parafina, todos com duração máxima de 20 minutos. As amostras foram incluídas em parafina (Figura 1a e 1b), realizados cortes de 4 micrômetros que foram corados em hematoxilina e eosina (HE).

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico nas objetivas de 4, 10 e 40 vezes. A identificação de quantidade suficiente de células com morfologia preservada foi o critério utilizado para a amostra ser considerada viável (Figura 1c, 1d, 1e e 1f).

Para o emprego da técnica acima descrita, foram feitos testes pilotos a fim de eleger o melhor fixador, tempo de centrifugação, e o tempo de processamento dos espécimes. Para tanto, foi utilizado como fixador o formol a 10%, álcool a 70% e álcool absoluto; também foram testados os tempos de 1 hora, 40 minutos e 30 minutos nos processos de desidratação e diafanização aplicados no processamento de rotina em histopatologia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização do tempo de fixação (24 a 48 horas) representa o primeiro ajuste na técnica responsável pela qualidade do material, já que amostras fixadas com tempo superior a 48 horas se mostraram endurecidas e ressecadas.

A análise do teste piloto aplicada aos diferentes fixadores mostrou que o uso do formol a 10% resultou em preservação da morfologia celular, porém o tempo do processamento foi maior devido à utilização do álcool amoniacal para a retirada de pigmento de formol, frequentemente observado nas amostras. A fixação pelo álcool 70% não propiciou a formação do agregado celular suficientemente consistente, fazendo-se necessário o uso do papel de seda para que as amostras permanecessem nos cassetes até o final do processamento, o que gerou frequente perda do material ou quantidade

insuficiente para inclusão em parafina e, conseqüente, redução na acurácia do exame.

Já a fixação pelo álcool absoluto provocou acentuada desidratação das amostras acarretando em dificuldade na inclusão em parafina, decorrente da dureza das amostras e assim inviabilizando a etapa de microtomia. A fixação pelo álcool a 95% mostrou ser adequada à formação dos agregados celulares destinados aos passos subseqüentes da rotina de inclusão em parafina, microtomia e coloração de rotina (Figura 1).

Quanto aos tempos aplicados à desidratação e diafanização das amostras, de 1 hora, 40 e 30 minutos, estes promoveram o endurecimento acentuado, tanto com o ressecamento quanto com o excesso de diafanização e impregnação pela parafina, o que também inviabilizou a etapa de microtomia. Os 3 banhos de álcool absoluto, 3 de xilol e 3 de parafina, todos com duração de no máximo 20 minutos, foram suficientes para a obtenção de espécimes de excelente qualidade, particularmente quanto à inclusão em parafina e microtomia.

Das 110 amostras da capa leucocitária de cães submetidos ao protocolo foi possível realizar a técnica com êxito em 75 amostras, ou seja, 68,0% de viabilidade (Figura 1a,1c e 1e). Nas demais 25 amostras, nas quais o processo de inclusão não foi viável, o material citológico recuperado foi insuficiente para formar um agregado constituído de celularidade representativa.

As amostras da punção de medula óssea (n=44), também revelaram viabilidade e preservação de material de reserva em 68% (Figura 1b), exibindo à microscopia óptica quantidade e qualidade na preservação da morfologia celular (Figura 1d e 1f).

Em ambos os casos, a escassez de material coletado foi conseqüente às dificuldades na coleta, ou mesmo por se tratar de animais de pequeno porte, nos quais o processo mecânico de formação do "pellet" mostrou-se inadequado, ocasionando perda durante os procedimentos subseqüentes.

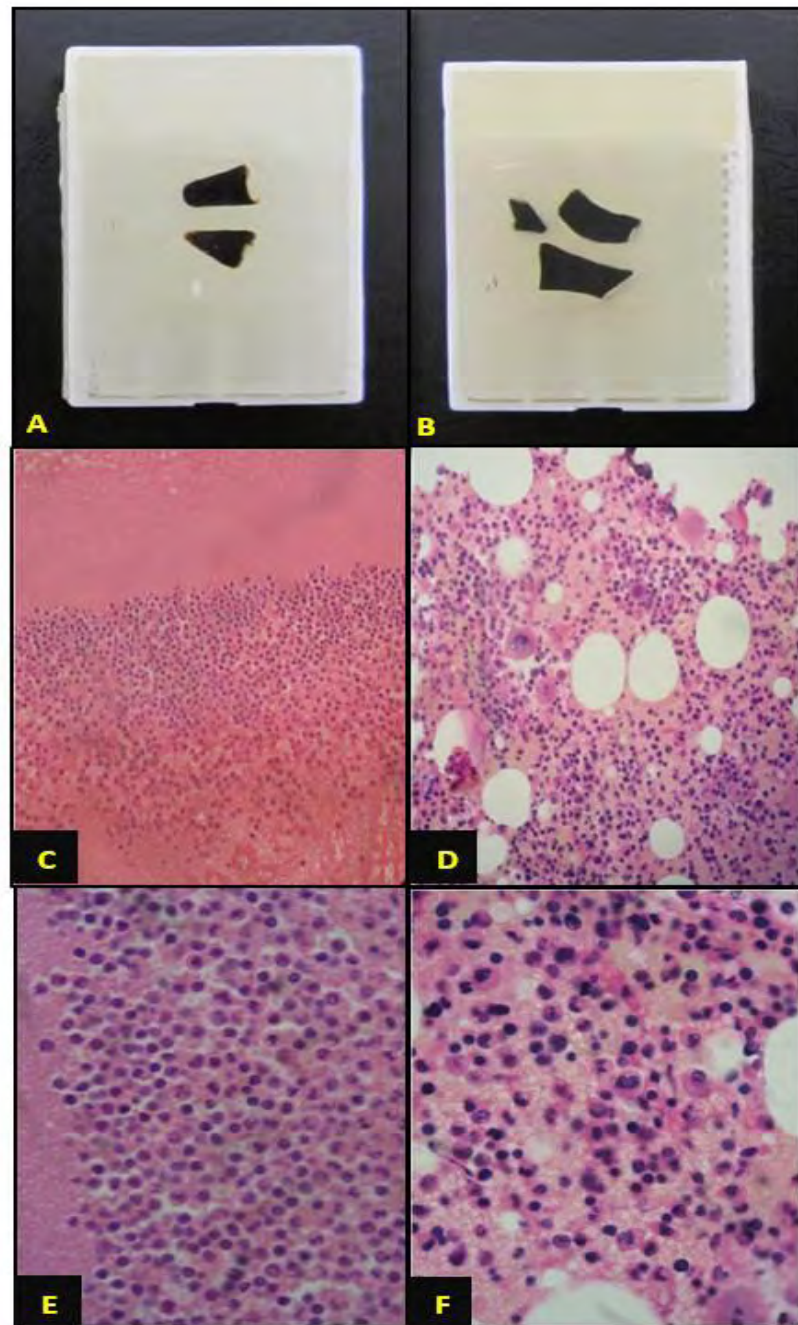


Figura 1- Ilustração de amostras de capa leucocitária e medula óssea. Aspecto das cito inclusões de capa leucocitária (A) e medula óssea (B) à macroscopia. População celular rica em leucócitos junto a hemácias em espécime de capa leucocitária (C e E),HE, objetiva de 10 e 40, respectivamente. População mista de células na medula óssea entremeadas por gotículas de gordura (D e F),HE objetiva de 10 e 40, respectivamente.

Vários fixadores são utilizados em técnicas de cito inclusão, como a formalina tamponada, solução de Bouin, ácido pícrico, fixador Carnoy, fixador B-5 mercúrio e etanol. Esta variedade está diretamente relacionada à diversidade de técnicas existentes, adaptadas à necessidade e especificidade de cada pesquisador (BALES; DURFEE, 1992; DOMAGALA et al., 1990; GURLEY et al., 1992; ZITO et al., 1995)

O tempo de processamento de amostras citológicas destinadas a cito inclusões geralmente é idêntico ao processamento histológico de rotina (ENGOHAN-ALOGHE et al., 2010; KULKARNI et al., 2008; NIGRO et al., 2007; SHIVAKURMARSWAMY et al., 2012), com poucas variações a fim de acelerar o processo, como o uso de reagentes aquecidos nos banhos histológicos (GANGANE et al., 2007). Devido à grande quantidade de hemácias no material utilizado neste estudo, fez-se necessária a adaptação do processo de cito inclusão a fim de evitar o ressecamento e endurecimento, mais frequente em amostras que contém quantidades apreciáveis de hemácias, como as utilizadas neste experimento.

A recuperação de leucócitos do sangue periférico pode ser obtida por métodos que utilizam a separação mecânica e a de gradiente de densidade com o emprego do Ficoll® (MILTENYI BIOTEC, 2011; SENGAR, 1968). Neste estudo foi escolhido o método de separação mecânica por se tratar de baixo custo, não necessitando de equipamento específico. A quantidade de leucócitos em meio a hemácias observados na análise microscópica foi adequada para o estabelecimento de critérios de diagnóstico.

Uma das principais dificuldades reside na manutenção de quantidade significativa do espécime após o processamento. Muito embora existam referências de pesquisas relacionadas ao uso das cito inclusões com finalidade diagnóstica, poucas são aquelas que fornecem detalhes sobre a metodologia empregada (KULKARNI et al., 2008).

CONCLUSÃO

Embora existam referências quanto ao uso de cito inclusões em diferentes aplicações, protocolos detalhados o suficiente para o desenvolvimento de técnica de forma detalhada raramente estão disponíveis. Neste trabalho, foi ressaltada a importância da padronização da técnica de cito inclusão especificamente para amostras de capa leucocitária e medula óssea, visando à obtenção de método fácil, de baixo custo e reprodutível, com vistas à obtenção de um diagnóstico complementar.

REFERÊNCIAS

ARDENGH, J.C; LOPES, C.V. ;LIMA, F.P.; VENCO, F. ; SANTO, G.C.;BEGNAMI, M. ;MÓDENA, J.L.P.. Cell block technique and cytological smears for the differential diagnosis of pancreatic neoplasms after endosonography-guided fine-needle aspiration. **Acta Gastroenterológica Latinoamericana**, London, v. 38, p. 246-251, 2008.

BALES, C.E.; DURFEE, G.R. Cytological technique, part 1. In: KOSS L.G. **Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases**. 4 ed. Philadelphia, PA, Lippincott,1992. p.1451-1474.

BURT, A.D.; SMILLIE, D.; COWAN, M.D. ; ADAMS, F.G. Fine needle aspiration cytology: Experience with a cell block technique. **Journal of Clinical Pathology**. v. 39, p. 114-115, 1986.

CHANDRA, S.; CHANDRA, H. Comparison of bone marrow aspirate cytology, touch imprint cytology and trephine biopsy for bone marrow evaluation. **Hematology Reports**. v. 3, p. 65:68, 2011.

DOMAGALA, W.M.; MARKIEWSKI, M.; TUZIAK, T.; KRAM, A.; WEBER, K. ; OSBORN, M. Immunocytochemistry on fine needle aspirates in paraffin miniblocks. **Acta Cytologica**. v. 34, p. 291-296, 1990.

ENGOHAN-ALOGHE, C.; HOTTAT, N. ; NOËL, J.C. Accuracy of lymph nodes cell block preparation according to ultrasound features in preoperative staging of breast cancer. **Diagnostic Cytopathology**. v. 38, p. 5-8, 2010.

GANGANE, N.; MUKERJI , M.S., ANSHU ; SHARMA, S.M. Utility of microwave processed cell blocks as a complement to cervico-vaginal smears. **Diagnostic Cytopathology**. v.35, p. 338-341, 2007.

GURLEY, A.M.; SILVERMAN, J.F.; LASSALETTA, M.M.; WILEY, J.E.; HOLBROOK, C.T.; JOSHI W. The utility of ancillary studies in pediatric FNA cytology. **Diagnostic Cytopathology**. v. 8, p. 137-146, 1992.

KEYHANI-RAFAGAS, S.; O'TOOLE, R.V.; LEMING, M.F. Role of cell block in fine needle aspiration cytology. **Acta Cytologica**. 28:630-631, 1984.

KROGERUS, L.A. ; ANDERSSON L.C. A simple method for the preparation of paraffin embedded cell blocks from fine needle aspirates, effusions and brushings. **Acta Cytologica**. Finland, v.32, p. 585-587, 1988.

KULKARNI, M.B.; DESAI, S.B; AJIT, D.; CHINOY, R.F. Utility of the thromboplastin-plasma cell-block technique for fine-needle aspiration and serous effusions. **Diagnostic Cytopathology**. v. 37, p. 85:90, 2008.

KUNG, I.T.; YUEN, R.W. ; CHAN, J.K. Technical notes: Optimal formalin fixation and processing schedule of cell blocks from fine needle aspirates. **Pathology**. v.21, p. 143-145, 1989.

LIU,K.; DODGE,R.; GLASGOW,B.J.; LAYFIELD,L.J. Fine-needle aspiration: comparison of smear, cytopsin, and cellblock preparations in diagnostic and cost effectiveness. **Diagnostic Cytopathology**. v.19,n.1, p.70-4, 1998.

MAYALL F,; CHANG B,; DARLINGTON A. A review of 50 consecutive cytology cell block preparations in a large general hospital. **Journal of Clinical Pathology**. v.50, p.985–990, 1997.

MILTENYI BIOTEC. **Manual: Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation**. Disponível em https://www.miltenyibiotec.com/download/protocols_sample_preparation_en/1396/SP_MC_PB_density_gradient.pdf. Acesso em 14 out 2011.

NATHAN N.A.; NARAYAN E,; SMITH M.M,; HORN M.J. Cell block cytology. Improved preparation and its efficacy in the diagnostic cytology. **American Journal of Clinical Pathology**. v.114, p.114:599–606, 2000.

NIGRO, K.; TYNSKI, Z.; WASMAN, J.; ABDUL-KARIM, F. ; WANG, N. Comparison of cell block preparation methods for nongynecologic thinprep specimens. **Diagnostic Cytopathology**.. 3, p. 640-643, 2007.

SENGAR, D.P.S.; JEROME, F.N. ; DOUGLAS, R.J. A simple method for separation of buffy coat from peripheral blood of chickens. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v. 32, p. 593-597, 1968.

SHIVAKUMARSWAMY, U.; ARAKERI, S.U.; KARIGOWDAR, H. ; YELIKAR B.R. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. **Journal of Cytology**. v. 29, p. 11- 15, 2012.

THAPAR, M.; MISHRA, R.K.; SHARMA, A.; GOYAL, V. ; GOYAL V. Critical analysis of cell block versus smear examination in effusions. **Journal of Cytology**. v. 26, p. 60-64, 2009.

VARSEGI,G.; SHIDHAM,V. Cell block preparation from cytology specimen with predominance of individually scattered cells. **Journal of Visualized Experiments**. n.29, p. 1-7, 2009.

ZITO, F.A.; GADALETA, C.D.; SALVATORE, C.; FILÁTICO, R.; LABRIOLA, A.; MARZULLO, A.A modified cell block technique for fine needle aspiration cytology. **Acta Cytologica**. v. 39, p. 93-99, 1995.

APÊNDICE A- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA VETERINÁRIA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivos e política editorial

A Revista Brasileira de Medicina Veterinária (RBMV) é uma publicação trimestral e multidisciplinar, da Sociedade de Medicina Veterinária do Estado do Rio de Janeiro (SOMVERJ) (www.somverj.org.br), que tem como objetivo publicar os resultados de trabalhos de pesquisa originais em todos os campos da Medicina Veterinária, visando o aprimoramento técnico-científico e profissional.

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por e-mail, de preferência na versão mais recente do Word, ao Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes, Editor da Revista Brasileira de Medicina Veterinária (www.rbmv.com.br), Av. Presidente Vargas, 446/1004, CEP 20085-900, Rio de Janeiro, RJ ou por via eletrônica, através do e-mail: lopes,rbmv@gmail.com. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Comitê Editorial, apoiado pela Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares, *peer review*, e são de inteira responsabilidade dos autores. O autor para correspondência (*) fica responsável pelo manuscrito perante a revista.

Os trabalhos devem ser organizados, sempre, em TÍTULO, TÍTULO EM INGLÊS, AUTORES, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes dois últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS. Os relatos de casos devem constar sempre de TÍTULO, TÍTULO EM INGLÊS, AUTORES, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, HISTÓRIO, DISCUSSÃO E/OU CONCLUSÃO E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. Em relatos de casos, o texto deve ser organizado, sempre, em INTRODUÇÃO, HISTÓRICO (Este deve ser constituído por Anamnese, material e métodos, e resultados), DISCUSSÃO E/OU CONCLUSÃO

ABSTRACT: deverá ser apresentado com os elementos constituintes do Resumo em português, podendo ser mais extenso. Ao final devem ser relacionadas às “KEY WORDS”;

RESUMO: deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português do trabalho, deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO. Ao final, devem ser relacionadas às “PALAVRAS-CHAVE”;

INTRODUÇÃO: deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

MATERIAL E MÉTODOS: devem ser reunir os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local. As citações incluídas no rodapé deverão ser indicadas por ordem alfabética

RESULTADOS: deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; Tabelas devem ser preparadas sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em tabelas extensas;

DISCUSSÃO: os resultados devem ser discutidos diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

CONCLUSÕES: devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

AGRADECIMENTOS: devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: só incluirá a lista da bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta; deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores (em caixa alta e baixa), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra.

Exemplos:

Artigo Científico

Carrington S.D., Bedford P.G.C., Guillon J.P. & Woodward E.G. Polarized light biomicroscopic observations on the pre-corneal tear film.3. The normal tear film of the cat. *J. Small Anim. Pract.*, 28:821-826, 1987.

Artigo Eletrônico

COBEA, Legislação & ética. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/ética.htm>>. Acesso em: 14 Mar, 2007.

Livro

Rodrigues H. *Técnicas anatômicas*. 2ª ed. Vitória, Arte Visual, 1998. 200p.

Capítulo de Livro

Strubbe A.T. & Gelatt K.N. Ophthalmic examination and diagnostic procedures, p.427-466. In: Gelatt K.N. (Ed.), *Veterinary Ophthalmology*. 3rd. ed. Philadelphia, Lipincott Willians & Wilkins, 1999.

Teses (Somente serão aceitas as que estiverem disponíveis em sites eletrônicos e os mesmos devem ser indicados no final da citação)

Abraão D.C. *Surto por Trypanosoma vivax em rebanho bovino leiteiro em Minas Gerais: Aspectos Epidemiológicos e Clínicos*. Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009. 83p. (Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/icb/index.php/pos-rad.html/150.164.27.227/diss_defesas_detalhes.php?aluno=338>)

Resumos de reuniões científicas

Não serão aceitos.

Revisões

Somente a convite do Editor.

Suplementos e Números Especiais

Somente após aprovação do comitê editorial.

Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

Os nomes dos autores no manuscrito não deverão ser citados de forma abreviada e sim na íntegra

Os trabalhos devem ser impressos em uma só face do papel, com margens de, no mínimo, 2,5cm e paginação na parte superior externa da página. As chamadas de rodapé devem ser digitadas após as "KEY WORDS" do ABSTRACT, sem uso da caixa de diálogo "Cabeçalho e rodapé". A formatação do original a ser submetido para publicação deve seguir o exemplo de apresentação do último fascículo da revista. O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e as

Tabelas no final. As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Devem ser introduzidos no texto do trabalho, através da ferramenta “Inserir” do Word, (imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade);

A redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. Abstract e Resumo serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

No rodapé da primeira página deverá constar título Profissional, maior título acadêmico se houver, endereço profissional completo do(s) autor(es), E-mail do autor para correspondência e dos demais autores;

Siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

Citações bibliográficas no texto serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, e ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais, em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo quando escaneadas pelo autor. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”) coloridos. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações); na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento

primordial a impressão das figuras poderá ser em cores. Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, e serão apresentadas no final do trabalho.

As Tabelas deverão ser explicativas por si mesmas e colocadas no final do texto. Cada uma terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando de a em cada Tabela; as notas serão lançadas logo abaixo da Tabela respectiva, da qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

Encargos

Quando pelo menos um dos autores for Médico-veterinário e sócio da SOMVERJ ou assinante da Revista Brasileira de Medicina Veterinária (por morar fora do Rio de Janeiro ou no Exterior), os artigos serão aceitos sem

taxas extras. Caso isso não ocorra, será cobrada a taxa de R\$ 300,00 reais, ou U\$ 150,00 do Exterior, por trabalho.