



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba

BRUNO MEDOLAGO DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DAS LESÕES
PULMONARES INFLAMATÓRIAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS
POR *LEISHMANIA INFANTUM*.**

Araçatuba

2024

BRUNO MEDOLAGO DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DAS LESÕES
PULMONARES INFLAMATÓRIAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS
POR *LEISHMANIA INFANTUM*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Fabrino Machado.

Araçatuba

2024

L732c

Lima, Bruno Medolago

Caracterização histopatológica e imunoistoquímica das lesões pulmonares inflamatórias em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* / Bruno Medolago Lima. -- Araçatuba, 2024
61 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Gisele Fabrino Machado

1. Inflamação. 2. leishmaniose visceral canina. 3. microscopia. 4. pulmões. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE BRUNO MEDOLAGO DE LIMA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 17 dias do mês de dezembro do ano de 2024, às 14h, no(a) Sala de aula nº 02 da Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de BRUNO MEDOLAGO DE LIMA, intitulada **CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DAS LESÕES PULMONARES INFLAMATÓRIAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Associada GISELE FABRINO MACHADO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Profa. Ass. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Prof. Dr. FERNANDO VISSANI FERNANDES (Participação Presencial) do(a) Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / Araçatuba-SP. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Profa. Associada GISELE FABRINO MACHADO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me acompanhado e assistido de perto em um dos momentos mais difíceis da minha vida e ter me concedido um milagre: minha cura. Sem a Sua graça, eu não estaria aqui realizando e conquistando mais um grande feito em minha vida. Ainda, por ter me guiado e iluminado, desde então, os meus passos por todo o meu caminho até aqui, e me amparado em meus momentos mais sombrios.

Ao meu bem mais precioso que já não está mais entre nós... meu amor maior, minha amada, guerreira e batalhadora mãe Ana Paula Medolago. Como eu queria poder abraçá-la e beijá-la agora; que participasse desse momento e vibrasse comigo; que visse o homem que ela criou mesmo em meio a todas as turbulências que enfrentou sendo mãe solo, muitas vezes ficando sem para que nós pudéssemos ter. Mãe, tudo o que eu conquistei e o que ainda irei conquistar é graças à senhora! Eu poderia viver cem vidas e, mesmo assim, não conseguiria expressar toda a minha gratidão, admiração, orgulho e amor que tenho pela senhora. Que Deus a tenha em Seus braços. Que você esteja feliz e sorrindo junto, também, do meu “avô-pai”, que era o seu xodó e seu espelho. Que você esteja livre de toda a dor, sofrimento, medo e angústia que sentiu aqui. Eu te amei, te amo e te amarei eterna e incondicionalmente, minha rainha!

Aos meus avós maternos Pedro Medolago e Jeni Scatola Medolago, que foram e são o meu coração; me criaram como um de seus filhos e me deram todo o amor e educação necessários para que eu acreditasse que tudo poderia acontecer na minha vida. À minha querida e maravilhosa irmã Kimberli Kamila Medolago de Lima, que enfrentou uma batalha árdua por tanto tempo e conseguiu se reestruturar; um dos meus ideais de superação. Ao meu companheiro Rodrigo de Oliveira e à sua família por todo o amor, carinho, paciência e compreensão ao longo desses três anos que se passaram; também à nossa filha de quatro patas, Morgana, por ser incrível simplesmente por existir em nossas vidas e pelos “presentinhos” de caça.

À minha professora e orientadora Gisele Fabrino Machado pela confiança e maravilhosa orientação não só neste projeto, mas também na vida. Que Deus a abençoe muito! À incrível professora Maria Cecília Rui Luvizotto, uma lenda viva e dona de um coração gigantesco, importante para a Patologia Veterinária e extremamente necessária para as nossas vidas. À professora ilustre e minha

orientadora do programa de Residência Daniela Bernadete Rozza, uma mulher forte, de caráter idôneo, dona de uma energia contagiante e de um coração generoso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“As aflições na Terra são os remédios da alma; elas salvam para o futuro, como uma operação cirúrgica dolorosa salva a vida de um doente e lhe devolve a saúde. É por isso que o Cristo disse: “Bem-aventurados os aflitos, pois eles serão consolados”.

(Allan Kardec)

RESUMO

São poucos os relatos na literatura sobre o mecanismo de resposta tecidual dos pulmões de cães com leishmaniose visceral canina (LVC). A avaliação histopatológica revelou pneumonia intersticial com infiltrado inflamatório linfohistioplasmocítico em 17/62 cães (27,41%) com LVC do grupo de animais infectados (G1). Nos pulmões com alterações inflamatórias (n=17) foi identificado, com a técnica de imunistoquímica, predomínio de linfócitos TCD3+ e baixa quantidade de macrófagos RCA-1 e CD204 positivos, além de formas amastigotas no interstício alveolar em 2/17 cães (11,7%). A fibrose foi classificada como discreta e observada no interstício pulmonar de 1/17 cão (5,88%). Houve correlação positiva entre o escore de inflamação e quantidade de linfócitos TCD3+ ($p=0,0001$) e macrófagos RCA-1 ($p=0,0225$) e CD204 ($p=0,0239$) positivos imunomarcados, mas negativa quando estes foram correlacionados com o estadiamento clínico e a presença de formas amastigotas pulmonares ($p=0,1141$, $p=0,4853$ e $p=0,3285$, respectivamente). Os macrófagos de fenótipo M2 corresponderam, em média, a 63,39% do número total de macrófagos pulmonares imunomarcados, sendo este subtipo predominante. De acordo com os resultados, as alterações inflamatórias pulmonares em cães com LVC não são comuns e, quando ocorrem, independem do parasitismo no tecido e do estadiamento clínico dos animais. O predomínio de macrófagos de fenótipo M2 indica se tratar de uma resposta imunológica do tipo Th2, contribuindo, assim, com a progressão da doença no tecido pulmonar.

Palavras-chave: inflamação; leishmaniose visceral canina; microscopia; pulmões.

ABSTRACT

There are few reports in the literature on the mechanism of tissue response in the lungs of dogs with canine visceral leishmaniasis (CVL). Histopathological evaluation revealed interstitial pneumonia with lymphohistioplasmacytic inflammatory infiltrate in 17/62 dogs (27.41%) with CVL from the group of infected animals (G1). In the lungs with inflammatory changes (n=17), using the immunohistochemical technique, a predominance of TCD3+ lymphocytes and a low number of RCA-1 and CD204 positive macrophages were identified, in addition to amastigote forms in the alveolar interstitium in 2/17 dogs (11, 7%). Fibrosis was classified as mild and was observed in the lung interstitium of 1/17 dogs (5.88%). There was a positive correlation between the inflammation score and the number of immunostained positive TCD3+ lymphocytes ($p=0.0001$) and RCA-1 ($p=0.0225$) and CD204 ($p=0.0239$) macrophages, but negative when these were correlated with clinical staging and the presence of pulmonary amastigote forms ($p=0.1141$, $p=0.4853$ and $p=0.3285$, respectively). M2 phenotype macrophages corresponded, on average, to 63.39% of the total number of immunostained lung macrophages, with this subtype being predominant. According to the results, pulmonary inflammatory changes in dogs with CVL are not common and, when they occur, they are independent of parasitism in the tissue and the clinical staging of the animals. The predominance of M2 phenotype macrophages indicates that it is a Th2 type of immune response, thus contributing to the progression of the disease in the lung tissue.

Keywords: inflammation; canine visceral leishmaniasis; microscopy; lungs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
EC	Estádio/Estadiamento Clínico
EI	Escore de Inflamação
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
HE	hematoxilina e eosina
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 2
IL-2	Interleucina 6
IL-4	Interleucina 4
LV	leishmaniose visceral
LVC	leishmaniose visceral canina
NO	óxido nítrico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
ROS	espécies reativas de oxigênio
Th1	Linfócitos T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 2
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PULMONAR	11
1.2	ANATOMIA E FISIOLOGIA DOS PULMÕES	12
1.2.1	Circulações sanguínea e linfática pulmonares	14
1.2.2	Mecanismos de defesa do trato respiratório.....	15
1.3	HISTOLOGIA PULMONAR	16
1.4	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	18
1.4.1	Estadiamento clínico da leishmaniose visceral canina	20
1.5	CICLO BIOLÓGICO	21
1.6	ALTERAÇÕES PULMONARES NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	22
1.7	O PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i> spp.	23
1.7.1	Imunomarcadores diagnósticos para macrófagos e seus subtipos na leishmaniose visceral.....	25
1.8	JUSTIFICATIVA	26
1.9	OBJETIVOS	26
2	MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1	ANIMAIS SELECIONADOS PARA O ESTUDO	27
2.2	COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	27
2.2.1	Análises hematológicas e bioquímicas.....	27
2.2.2	Análise histopatológica.....	28
2.2.3	Reação imunoistoquímica	28
2.2.4	Análise estatística.....	29
3	RESULTADOS	31
3.1	ESTADIAMENTO CLÍNICO.....	31
3.2	ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS PULMONARES	32
3.3	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....	34
4	DISCUSSÃO	41
5	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA	56
	APÊNDICE A - TABELAS SUPLEMENTARES.....	56

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose continua sendo um importante problema de saúde em quatro regiões ecoepidemiológicas do mundo: Américas, África Oriental, Norte da África e Oeste e Sudeste Asiático. A transmissão se dá pela inoculação das formas promastigotas infectantes do protozoário através da picada da fêmea flebotomínea da subfamília Phlebotominae, também conhecida como tatuquira, asa branca, mosquito-palha, birigui e cangalhinha (Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS, 2021).

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença infecciosa multissistêmica de caráter zoonótico, causada por um protozoário flagelado do gênero *Leishmania*. O cão doméstico é o principal reservatório do agente (Morales-Yuste; Martín-Sánchez; Corpas-Lopez, 2022). O tráfego sistêmico de macrófagos infectados pelo protozoário promove uma reação imunológica crônica do tipo granulomatosa em diversos órgãos, incluindo o trato respiratório (Kavarnos *et al.*, 2022; Magalhães *et al.*, 2016). A infecção respiratória pode resultar em sinais clínicos como tosse improdutiva e anormalidades da ausculta pulmonar (Kavarnos *et al.*, 2022) a descarga nasal catarral, epistaxe, espirro e dispneia (Magalhães *et al.*, 2016; Silva, A. *et al.*, 2013).

O acometimento dos pulmões na LVC resulta em pneumonia intersticial crônica focal ou difusa, caracterizada por infiltrado celular composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e fibrose intersticial (Alves *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 1986; Gonçalves *et al.*, 2003; Kavarnos *et al.*, 2022; Magalhães *et al.*, 2016; Paulino Jr. *et al.*, 2013; Tafuri *et al.*, 2001; Toplu; Aydogan, 2011). Duarte *et al.* (1986) classificaram as alterações pulmonares inflamatórias em cães com LVC em três diferentes tipos, baseadas na presença exclusiva de infiltrado inflamatório (celular), aumento de tecido conjuntivo intersticial dado por fibroblastos que se sobressaem à quantidade de células mononucleares (fibrótico) e, por último, no equilíbrio entre a deposição de tecido conjuntivo e o processo inflamatório (fibrótico-celular).

Os linfócitos T são de grande importância na imunomodulação e resistência à *Leishmania* spp., sobretudo as células T CD4⁺ e T CD8⁺. A ativação dessas células culmina em uma resposta celular com secreção de diferentes citocinas específicas contra o parasito, como a IL-2, IL-12 e INF- γ . A susceptibilidade à doença envolve a participação da IL-10 e de células B produtoras de anticorpos (Goto; Prianti, 2009), os quais podem ser detectados em títulos excepcionalmente elevados e acarretar a

formação e deposição de imunocomplexos, resultando em uma forma grave da doença (Ozbilge *et al.*, 2006).

A plasticidade dos macrófagos presentes no tecido pulmonar em decorrência da infecção por *Leishmania* spp. faz com que estas células apresentem diferentes fenótipos que podem interferir de forma positiva ou negativa no desfecho da doença tanto em animais como em humanos a partir da produção e liberação de diversos agentes químicos pró-inflamatórios e/ou regulatórios e imunomoduladores (Arango Duque; Descoteaux, 2014; Cassetta; Cassol; Poli, 2011; Muxel *et al.*, 2017; Scott; Novais, 2016; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Zanluqui; Wowk; Pinge-Filho, 2015).

São poucos os estudos disponíveis na literatura sobre o mecanismo de resposta tecidual dos pulmões ao protozoário em cães e humanos (Kavarnos *et al.*, 2022; Magalhães *et al.*, 2016; Tuon *et al.*, 2009), incluindo a determinação do perfil fenotípico de macrófagos em tecido pulmonar de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

O presente projeto tem como objetivo, portanto, a caracterização histopatológica e imunoistoquímica das lesões pulmonares inflamatórias em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, bem como o estudo da expressão do fenotípica dos macrófagos pulmonares presentes na infecção e sua correlação com as lesões observadas e o estadiamento clínico dos animais do estudo.

1.1 FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PULMONAR

O desenvolvimento dos pulmões compreende seis estágios de evolução, os quais incluem as fases embrionária, pseudoglandular, canalicular e sacular, a fase pós-natal alveolar, e, ainda, os estágios de maturação vascular. Na fase pseudoglandular ocorre o desenvolvimento completo da via aérea condutora até a formação dos bronquíolos terminais; a farta proliferação de capilares no interstício dos pulmões somada ao início da formação acinar caracterizam a fase canicular. O estágio sacular, por sua vez, compreende a expansão da área de troca gasosa do pulmão fetal. Os alvéolos completam o seu ciclo de desenvolvimento somente após o nascimento, durante a vida neonatal (Avery; Flecher; MacDonald, 1999; Maxie, 2007; Miyoshi; Guinsburg, 1998). Os estágios críticos de desenvolvimento de grande parte dos mamíferos ocorrem na vida pós-natal. Estudos sugerem que, em carnívoros,

durante a vida intrauterina, as fases pseudoglandular, canicular e sacular ocorrem a partir do 32º, 47º e 55º dia, respectivamente (Latshaw, 1987; Miyoshi; Guinsburg, 1998).

Durante a vida intrauterina, um divertículo no folheto endodérmico ventral dá origem aos pulmões, e, juntamente com os brônquios principais direito e esquerdo, se desenvolve a traqueia primordial. As vias aéreas condutoras são revestidas por epitélio cilíndrico cranialmente, e, mais caudalmente, por epitélio cuboide, ambos ciliados. Neste período, em virtude da composição e localização distante dos vasos do epitélio respiratório, além do baixo fluxo sanguíneo, a respiração torna-se impossibilitada (Avery; Flecher; MacDonald, 1999; Banks, 1992; Maxie, 2007; Miyoshi; Guinsburg, 1998).

O início da produção do surfactante, que ocorre na fase sacular, dá origem a uma maturação funcional do parênquima pulmonar, promovendo a capacidade da realização de trocas gasosas dos sacos alveolares, bem como semelhança das relações de pressão e volume pulmonares às de um animal adulto. Os primeiros alvéolos, na íntegra, se formam após a involução de septos intersaculares e depósito de fibras elásticas. Entretanto, a aquisição da interface “sangue-gás” só ocorre na última etapa do desenvolvimento que compreende a vida pós-natal, a maturação microvascular (Maxie, 2007; Miyoshi; Guinsburg, 1998).

1.2 ANATOMIA E FISIOLOGIA DOS PULMÕES

Os pulmões constituem parte dos órgãos do trato respiratório inferior e são considerados essenciais para a respiração, uma vez que são responsáveis pelas trocas gasosas entre o ar inspirado e a corrente sanguínea. Já os órgãos que conduzem o ar inspirado para o interior do parênquima pulmonar são tidos como auxiliares ao trato respiratório, apesar de possuírem papéis de extrema importância em outros sistemas como sensoriais na cavidade nasal, funções digestivas na faringe e, ainda, nos seios paranasais para atuação na fonação. Os pulmões ocupam a maior parte da cavidade torácica, e são compostos pelos pulmões direito e esquerdo, estando ambos conectados na bifurcação traqueal e invaginados no saco pleural correspondente. Cada pulmão é revestido pela pleura visceral de maneira independente, porém unidos através do mediastino. A cavidade torácica alberga uma

discreta quantidade de líquido seroso, com o intuito diminuir o atrito entre as pleuras visceral e parietal durante os movimentos respiratórios (Dyce; Sack; Wensing, 2010; König; Liebich, 2016).

Os pulmões possuem textura esponjosa em decorrência do preenchimento por ar, o qual confere crepitação à palpação, e apresentam consistência elástica, responsável esta pela capacidade de expansão e compressão pulmonares seguidas de inspiração e expiração, respectivamente. A coloração varia de acordo com o teor sanguíneo presente no tecido pulmonar, compreendendo desde rosa pálido a vermelho escuro quando totalmente preenchidos por sangue (Dyce; Sack; Wensing, 2010; König; Liebich, 2016).

Estruturalmente, os pulmões são compostos por lobos pulmonares constituídos de lóbulos delimitados por septos interlobulares, os quais são imperceptíveis no cão e provindos de um prolongamento da cápsula fibrosa disposta sob a pleura visceral, contendo parênquima e interstício/estroma. O parênquima compreende o órgão onde haverá trocas gasosas entre o ar atmosférico e o dióxido de carbono sanguíneo, sendo formado por bronquíolos e seus ramos, bem como os alvéolos pulmonares terminais. Já o interstício compõe-se de tecido mole elástico e colágeno, onde estão situados as glândulas mistas, fibras musculares lisas, fibras nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos. Os lobos pulmonares, por sua vez, são classificados de acordo com a ramificação da árvore brônquica que os compõem. Na espécie canina e nas demais espécies domésticas, com exceção do cavalo, o pulmão esquerdo é dividido em dois lobos (cranial e caudal) e o direito, em quatro lobos, os quais compreendem o cranial, médio, caudal e o acessório (Dyce; Sack; Wensing, 2010; König; Liebich, 2016; Maxie, 2007).

Topograficamente, cada pulmão possui uma face costal, uma face mediastinal e uma face diafragmática. A primeira consiste em uma face convexa adjacente à parede torácica; a face mediastinal situa-se em direção ao mediastino, e, a diafragmática, posiciona-se de forma oposta ao diafragma. O ápice pulmonar se prolonga em sentido cranial pela abertura do tórax até a porção visceral do pescoço. O hilo pulmonar compreende a região onde se recebe o brônquio principal junto dos vasos pulmonares, os quais incluem artéria e veia pulmonar, artéria e veia brônquicas e vasos linfáticos, bem como nervos; termo "raiz do pulmão" refere-se coletivamente aos vasos e brônquios lobares que ligam o pulmão ao mediastino. A manutenção dos

pulmões em seus devidos lugares é dada pela fixação de ambos à traqueia, ao sistema vascular, ao mediastino e à pleura, da qual emerge o ligamento pulmonar dorsomedial que conecta os pulmões com o mediastino e o diafragma (International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2017; König; Liebich, 2016).

1.2.1 Circulações sanguínea e linfática pulmonares

A circulação pulmonar e a circulação brônquica constituem os dois sistemas que conferem o fluxo sanguíneo que flui para os pulmões, sendo consideradas de alto fluxo e baixa pressão e baixo fluxo e alta pressão, respectivamente (König; Liebich, 2016; Maxie, 2007). A circulação pulmonar promove a perfusão dos capilares alveolares a partir do débito total provindo do ventrículo direito, e participa, também, nas trocas gasosas. A circulação brônquica, por sua vez, é tida como um ramo da circulação sistêmica, e fornece suprimento sanguíneo às vias aéreas e outras estruturas no interior dos pulmões (Klein, 2014).

Os brônquios, bronquíolos e ductos alveolares são acompanhados pelas artérias pulmonares principais e seus ramos, as quais são, estruturalmente, elásticas (presentes nos brônquios) e musculares (adjacente aos bronquíolos e ductos alveolares), o que determina a reatividade da vasculatura frente à hipóxia alveolar e a outros estímulos neurais e humorais. A superfície do septo alveolar é quase totalmente recoberta por uma rede vascular conferida pelas artérias pulmonares que conduzem os capilares. Há um reservatório sanguíneo venoso, o qual é constituído pelas veias pulmonares de paredes delgadas que direcionam o sangue dos capilares pulmonares para o átrio esquerdo, disponível para mudanças repentinas no débito cardíaco (Klein, 2014). As artérias pulmonares conduzem o sangue venoso até os alvéolos através de ramificações pela árvore brônquica, onde culminam em capilares. Um único alvéolo recebe aporte sanguíneo de até dez capilares. As artérias bronquiais podem ascender de diversas áreas como da aorta, artérias intercostais e artérias subclávicas (König; Liebich, 2016; Maxie, 2007).

A drenagem linfática dos pulmões é feita pelos linfonodos traqueobrônquicos, os quais encontram-se ao redor da bifurcação da traqueia e são classificados de acordo com a sua topografia em linfonodos esquerdos, médios e direitos. Após ser

drenada pelos nodos linfáticos traqueobrônquicos, a linfa segue pelos linfonodos mediastinais até o ducto torácico (König; Liebich, 2016).

1.2.2 Mecanismos de defesa do trato respiratório

A conformação anatômica da cavidade nasal e dos brônquios previne ou reduz a deposição de agentes nocivos nos pulmões, sobretudo nos alvéolos, os quais compreendem as estruturas mais vulneráveis do trato respiratório. A significativa turbulência do fluxo de ar gerado pela disposição espiralada dos cornetos nasais e os meatos nasais estreitos promovem forças físicas que induzem uma colisão de partículas de mais de 10 μm com a superfície da mucosa nasal. Caso forem menores, entre 2 e 10 μm , estas partículas se deparam com uma segunda barreira nas bifurcações traqueal e dos brônquios, promovendo um impacto na mucosa brônquica em virtude das mudanças abruptas na direção do ar (inércia). Os aerossóis infectantes contendo vírus e bactérias, entretanto, possuem tamanhos que variam de 0,01 a 2 μm , e podem ganhar acesso às regiões de transição e troca gasosa (bronquíolo e alvéolo, respectivamente) por meio da sedimentação resultante da gravitação e/ou da difusão (López, 2007; Maxie, 2007; Zachary, 2018).

A depuração mucociliar, realizada pela cobertura mucociliar do sistema condutor, consiste em um sistema de exclusão de resíduos e compreende um dos principais mecanismos de defesa do trato respiratório. O muco produzido pelas células caliciformes, serosas, glândulas submucosas e fluido transepitelial funciona como barreira e veículo, e consiste em uma mistura complexa de água, glicoproteínas, imunoglobulinas, lipídios e eletrólitos, e dispõe-se em duas camadas: interna e externa. A camada externa possui aspecto viscoso, enquanto a camada interna é fluida, e encontra-se em contato íntimo com os cílios. Estes últimos se movimentam de forma rápida, forte e sincronizada, e impulsionam o muco, as células esfoliadas e as partículas retidas para fora do trato respiratório em direção à faringe; o muco, então, é deglutido ou expelido do sistema condutor pela tosse (Alessi; Santos, 2023; Zachary, 2018).

Na região de colisão da mucosa brônquica estão as células M, que consistem em células epiteliais modificadas que recobrem o tecido linfoide associado aos brônquios (BALT). A partir dessa região, os antígenos são fagocitados e transportados

para o BALT por macrófagos, células dendríticas e outras células apresentadoras de antígenos (APCs) para serem apresentados para os linfócitos B e T, desencadeando, assim, uma resposta humoral e/ou celular com produção de imunoglobulinas (Zachary, 2018). Dentre os anticorpos mais abundantes presentes nas secreções nasais e na traqueia destaca-se a imunoglobulina (IgA), a qual tem função de prevenir a adesão e absorção de antígenos. A imunoglobulina G (IgG), por sua vez, e em menor proporção as imunoglobulinas E e M (IgE e IgM, respectivamente), assume o papel de destruição dos patógenos por meio da fagocitose. A IgG é a mais abundante na superfície dos alvéolos, e age como anticorpo na opsonização para macrófagos alveolares e neutrófilos (López, 2007).

Os macrófagos pulmonares são classificados em cinco grupos celulares distintos de acordo com sua localização, os quais compreendem macrófagos alveolares, macrófagos intersticiais, macrófagos pulmonares intravasculares, macrófagos pleurais e células dendríticas que, apesar de não serem consideradas como macrófagos, são células fagocíticas profissionais (Maxie, 2007); ambos conduzem a resposta à doenças crônicas e/ou granulomatosas, como ocorre na infecção por protozoários do gênero *Leishmania* spp (Carneiro *et al.*, 2021; Zachary, 2018). Tal resposta cria um microambiente inflamatório onde há produção e liberação de diferentes sinais capazes de ativar essas células, fazendo com que apresentem fenótipos funcionalmente distintos determinados pelas formas de ativação com expressão dos fenótipos M1 e M2; o fenótipo expresso por esses macrófagos determina o padrão de resposta frente à doença (Carneiro *et al.*, 2021; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018), podendo resultar, de acordo com o seu potencial, em dificuldade nas trocas gasosas, injúrias teciduais e fibrose intersticial (Maxie, 2007).

1.3 HISTOLOGIA PULMONAR

Os brônquios e bronquíolos, que correspondem às vias aéreas de condução intrapulmonar, compõem aproximadamente 6% dos pulmões; 85% são constituídos por bronquíolos respiratórios, dutos alveolares e alvéolos; os 9 a 10% do restante dos pulmões são compostos por pleura visceral, a qual consiste em uma camada de tecido conjuntivo revestida por células mesoteliais, tecido nervoso e vascular

intrapulmonares (artérias e veias pulmonares e artérias brônquicas) (Eurell; Frappier, 2012).

A área de trocas gasosas é organizada em unidades funcionais, chamadas de ácinos, ou estruturais chamadas de lóbulos. A primeira inclui todos os espaços aéreos distais a um bronquíolo terminal simples, incluindo bronquíolos respiratórios, dutos alveolares, sacos alveolares e alvéolos. Os lóbulos, por sua vez, compreendem um conjunto de ácinos delimitados por septos de tecido conjuntivo denominado septo interlobular, que compõe-se de fibras de colágeno e fibras elásticas e de vasos sanguíneos (Eurell; Frappier, 2012; Mescher, 2016).

Os brônquios em geral possuem aspecto histológico semelhante ao da traqueia, com exceção da organização da cartilagem e da musculatura lisa. Basicamente, são revestidos por um epitélio respiratório composto por células ciliadas, células secretórias e células basais, mudando sua composição no sentido proximal-distal, onde as células mucosas e basais apresentam-se em menor quantidade, enquanto se sobressaem as células exócrinas bronquiolares. Na submucosa estão presentes as glândulas mistas brônquicas permeadas por tecido conjuntivo frouxo; a cartilagem hialina se dispõe em forma de placas irregulares e é entremeada por músculo liso (Eurell; Frappier, 2012; Mescher, 2016).

Os bronquíolos se originam dos brônquios e se ramificam até que assumam as suas diferentes formas até serem denominados como bronquíolos terminais. São circulares em cortes transversais e revestidos por epitélio colunar ou cuboide simples, composto por células ciliadas e células exócrinas bronquiolares (células de Clara), as quais possuem características secretórias e são capazes de metabolizar compostos xenobióticos. A submucosa compõe-se de tecido conjuntivo frouxo e, diferentemente dos brônquios, não há tecido glandular e cartilaginoso; estão presentes o músculo liso e, imediatamente abaixo do epitélio, numerosas fibras nervosas. O bronquíolo respiratório, por sua vez, difere dos bronquíolos terminais pelo fato de apresentarem o epitélio projetando-se para o tecido de trocas gasosas, os alvéolos. As estruturas tubulares originadas a partir da ramificação dos bronquíolos respiratórios dão origem aos dutos alveolares, que terminam em um aglomerado de alvéolos chamados de sacos alveolares (Eurell; Frappier, 2012; Mescher, 2016).

Os alvéolos são tidos como a unidade básica para trocas gasosas no parênquima pulmonar, e compreendem espaços aéreos de formato esférico,

separados por septos interalveolares e revestidos por epitélio composto por dois tipos celulares: pneumócitos do tipo I – células epiteliais alveolares achadas; e pneumócitos do tipo II – célula epitelial alveolar cuboide com microvilos de superfície. O tipo II, ainda, é classificado como célula progenitora para as células dos tipos I e II. Os septos interalveolares são folhetos de tecido conjuntivo intersticial interalveolar que contém um plexo capilar, fibras colágenas e elásticas e fibrócitos; podem estar presentes pericitos, macrófagos alveolares, linfócitos e plasmócitos (Eurell; Frappier, 2012). Os pneumócitos do tipo I constituem o lado alveolar da barreira hematoaérea, a qual compreende uma camada líquida superficial de revestimento e surfactante pulmonar presente na fusão das lâminas basais da célula epitelial alveolar e da célula endotelial capilar subjacente (Eurell; Frappier, 2012; Mescher, 2016).

1.4 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença multissistêmica de evolução lenta e início insidioso (Costa *et al.*, 2020), causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, sendo a *Leishmania infantum* a principal espécie envolvida na doença canina (Morales-Yuste; Martín-Sanchez; Corpas-Lopez, 2022). A transmissão se dá por meio da picada da fêmea flebotomínea, excepcionalmente da espécie *Lutzomyia longipalpis*, também conhecido como mosquito-palha, birigui ou tatuquira (Albuquerque; Langoni, 2018). Os cães são os principais reservatórios deste agente em áreas urbanas (Ávila *et al.*, 2018), porém, o parasita tem sido reportado em felinos domésticos (Martín-Sánchez *et al.*, 2007), coelhos, lebres e roedores selvagens (Carrillo; Moreno; Cruz, 2013; Díaz-Sáez *et al.*, 2014) e outros animais silvestres, como lobos, raposas, chacais e ginetas (Quinnell; Courtenay, 2009).

O percurso sistêmico de macrófagos infectados por formas amastigotas de *Leishmania infantum* promove reações inflamatórias do tipo granulomatosa em diversos tecidos, incluindo tegumento, olhos, nodos linfáticos, baço, fígado, rins e trato gastrointestinal (Morales-Yuste; Martín-Sanchez; Corpas-Lopez, 2022), bem como sistema nervoso central (Frigerio, 2023) e trato respiratório (Kavarnos *et al.*, 2022; Magalhães *et al.*, 2016).

Os sinais clínicos apresentados, quando apresentados, variam de acordo com o sistema acometido e a resposta imune gerada a partir da interação entre parasita e

hospedeiro, podendo este se tornar um portador assintomático quando tal interação encontrar-se em equilíbrio ou sintomático quando desequilibrada, resultando em doença clínica (Alvar *et al.*, 2020; García-Castro *et al.*, 2022). Nas espécies humana e canina observam-se linfadenomegalia, distúrbios hemorrágicos, anemia, perda de peso, hepatoesplenomegalia, desnutrição, infecções secundárias e hipertermia; ocasionalmente, em humanos, pode haver tosse, distúrbios gastrintestinais, alopecia, dermatopatias e edema de regiões periféricas. Em cães as alterações dermatológicas geralmente estão presentes e consistem em dermatite esfoliativa com descamação branca prateada em regiões de cabeça, orelhas e extremidades; hiperqueratose em região de focinho, onicogribose, dermatite ulcerativa, uveíte anterior, conjuntivite, rinite, pneumonia do tipo intersticial, secreção ocular, poliartrite e glomerulonefrite também podem ocorrer (Contreras *et al.*, 2019).

O diagnóstico da LVC é complexo, levando-se em conta a grande variedade de sinais clínicos e sua inespecificidade, quando presentes, além do custo dos exames necessários para concluir o diagnóstico (Maia, 2013; Nishida; Delmaschio, 2017). Para um diagnóstico preciso e seguro, são necessárias combinações de exames e observação dos sinais clínicos apresentados pelo animal. De forma breve, utiliza-se o teste rápido imunocromatográfico para detecção qualitativa de anticorpos anti-*Leishmania* spp.; exame parasitológico, onde faz-se possível a visualização do protozoário na microscopia; exames sorológicos baseados na detecção e quantificação de anticorpos séricos; exame imunoistoquímico, o qual identifica a presença do parasito em secções histológicas; e exames biomoleculares, como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que se baseia na detecção do DNA do parasito (Rocha; Shiosi; Freitas, 2020). Dentre os métodos citados, destacam-se o exame parasitológico e o PCR como os mais confiáveis, visto que ambos apresentam 100% de especificidade. Entretanto, a carga parasitária apresentada pelo animal interfere em sua sensibilidade (Costa *et al.*, 2020).

Não existe comprovação de cura da LVC. Atualmente, existem medicamentos capazes de reduzir significativamente a carga parasitária no organismo e aliviar os sinais clínicos, culminando na melhora da qualidade de vida do animal. Entretanto, o tratamento e o acompanhamento do animal serão feitos pelo médico veterinário para o resto de sua vida. Vale ressaltar a importância do emprego de coleiras especiais à

base de inseticida em cães, sendo estes portadores ou não infectados, para evitar que sejam picados pelo vetor transmissor do protozoário (Fiocruz, 2022).

1.4.1 Estadiamento clínico da leishmaniose visceral canina

A sintomatologia clínica e anomalias clínico-patológicas são consequências da relação parasita-hospedeiro junto a manifestação da resposta imunológica gerada em decorrência desta interação. Entretanto, a doença clínica pode não ser manifestada por longos períodos após contato com o agente; esta condição pode alcançar cerca de 60% dos cães residentes em áreas consideradas endêmicas para a doença (Silva *et al.*, 2021).

Anteriormente a classificação clínica dos cães enfermos era pontuada de 1 a 3, baseando-se nas alterações observadas por meio do exame físico. Animais que não apresentavam nenhuma manifestação eram classificados como “1 – assintomáticos”; na vigência de até três sinais clínicos classificava-se como “2 – oligossintomáticos”; os animais classificados como “3 – sintomáticos” apresentavam, no mínimo, três manifestações clínicas. Entretanto, tal padrão de estadiamento, por não considerar as alterações em órgãos internos com ausência de manifestações clínicas detectáveis, é consideravelmente limitado (Nogueira; Ribeiro, 2015).

Atualmente, o protocolo para estadiamento clínico da LVC baseia-se, principalmente, em método sorológico quantitativo para avaliação dos níveis séricos de anticorpos, exame parasitológico direto, achados laboratoriais relacionados a doença renal progressiva e gravidade das lesões. Os estádios compreendem de I a V: I) Sem doença - animais sem doença clínica com baixos níveis de anticorpos, parasitológico negativo e sem alterações laboratoriais; II) Sem doença / doença leve - sorologia negativa/positiva com níveis baixos a médios de anticorpos, sinais clínicos ausentes ou leves com linfadenopatia periférica, dermatite papular e, geralmente, sem alterações laboratoriais de perfil renal; III) Doença moderada – baixos a altos níveis de anticorpos, parasitológico positivo, sinais clínicos do estágio II e outros como lesões cutâneas difusas, onicogribose, dermatite exfoliativa, epistaxis, febre e emagrecimento, anomalias em exames laboratoriais (anemia não regenerativa, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, com creatinina <1,4 mg/dl e RPC <0,5); IV) Doença grave - médios a altos níveis de anticorpos, parasitológico positivo, sinais

do estágio III com lesões decorrentes da deposição de imunocomplexos como vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite, com creatinina de 1,4 a 2 mg/dl e RPC >1,0); V) Doença muito grave – médios a altos níveis de anticorpos, parasitológico positivo, sinais do estágio IV com adição de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final, com alterações laboratoriais do estágio III/IV, creatinina >5,0 mg/dl e marcada proteinúria renal com RPC >5 (Brasileish Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal, 2018).

1.5 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo de vida da *Leishmania* spp. é completado com intermédio de dois hospedeiros, sendo um vetor flebotomíneo e um mamífero. Durante o repasto sanguíneo em um cão infectado, a fêmea flebotomínea ingere a forma amastigota do protozoário, a qual, no trato digestório do vetor, assume a forma promastigota evolutiva infectante que se multiplica e migra para a faringe do inseto. No próximo repasto sanguíneo em um mamífero hígido, a fêmea flebotomínea inocula a forma promastigota infectante do protozoário através da picada. Posteriormente, os macrófagos migram para o local da inoculação e fagocitam as formas infectantes que, no interior destas células, se transformam em formas amastigotas e se multiplicam por divisão binária, promovendo ruptura celular com consequente liberação na corrente sanguínea (Blanco; Nascimento-Júnior, 2017).

O odor corporal dos hospedeiros, bem como sua temperatura corpórea, é atrativo para as fêmeas flebotomíneas. Apesar de não apresentarem demasiada exigência em relação à alimentação, esses vetores, na maioria das vezes, se alimentam em horários crepusculares ou no período noturno, e permanecem em seus abrigos durante o dia (Brazil; Rodrigues; Andrade Filho, 2015). Locais com matéria orgânica em decomposição, pouca luminosidade e com umidade relativa criam um ambiente ótimo para o seu desenvolvimento (Aguiar; Medeiros, 2003).

Sabe-se que mais de 927 espécies atuais de flebotomíneos e 22 fósseis foram descritas; destas, cerca de 500 atuais e 16 fósseis são encontradas no Novo Mundo. No Estado de São Paulo, foram relatadas 69 espécies (Galati, 2003; Galati; Fonseca; Marassá, 2007; Shimabukuro; Marassá; Galati 2007), incluindo vetores responsáveis pelos casos de leishmaniose cutânea, os quais incluem *Nyssomyia intermedia sensu*

lato e *N. whitmani*, e da leishmaniose visceral, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Rangel; Lainson 2003). Este último possui caráter oportunista, comportamento antropofílico e hábito alimentar variado, características estas que favorecem a transmissão de patógenos como a *L. infantum*. Ainda, adapta-se facilmente em ambientes diversificados, podendo ser encontrado tanto em espaços domiciliares como peridomiciliares (Rangel; Lainson, 2003).

Além do vetor flebotomíneo, outros estudos identificaram a presença de *Leishmania* spp. em pulgas (Colombo *et al.*, 2011) e nos intestinos, aparelho reprodutor e glândulas salivares de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (Viol *et al.*, 2016) presentes em animais naturalmente infectados. Entretanto, o envolvimento do carrapato no processo de transmissão do protozoário permanece não estabelecido.

1.6 ALTERAÇÕES PULMONARES NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O envolvimento dos pulmões na leishmaniose visceral humana (LV), bem como a sintomatologia clínica resultante do acometimento, é considerado raro, e foi descrito pela primeira vez por Andrade (1959). Duarte *et al.* (1989) identificaram pneumonite intersticial com células mononucleares em 76,8% de 13 casos estudados de LV; destes, 53,8%, ainda, apresentavam focos de fibrose septal e em 3 casos foi possível observar o protozoário no interior de macrófagos. Em relação aos sinais clínicos provenientes do trato respiratório inferior, a tosse seca foi identificada em um percentual de pacientes em estudos retrospectivos e relatos de casos singulares (Dasgupta *et al.*, 2014; Kotsifas *et al.*, 2011; Marshall *et al.*, 2000; Rosenthal; Marty; Pesce, 1991; Sarker *et al.*, 2003); derrame pleural também foi descrito (Chenoweth *et al.*, 1993; Matheron *et al.*, 1992), além de distúrbio ventilatório restritivo com diminuição do volume pulmonar associado à presença de macrófagos intersticiais, resultando cronicamente em fibrose parenquimatosa (Silva, L. *et al.*, 2013). Em cães, os sinais clínicos pulmonares são infrequentes e, quando presentes, podem variar de tosse leve improdutiva e ausculta pulmonar anormal (Kavarnos *et al.*, 2022) a descarga nasal catarral, epistaxe, espirro e dispneia (Magalhães *et al.*, 2016; Silva, A. *et al.*, 2013).

Na LVC, já se conhece o acometimento dos pulmões pelo protozoário. Assim como ocorre na LV, as alterações pulmonares histopatológicas se baseiam em pneumonia do tipo intersticial focal ou difusa crônica com ou sem fibrose, sendo considerados achados comuns, caracterizados pelo espessamento dos septos interalveolares com infiltração por células mononucleares, as quais incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos, com proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno no interstício (Alves *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 1986; Gonçalves *et al.*, 2003; Kavarnos *et al.*, 2022; Magalhães *et al.*, 2016; Paulino *et al.*, 2013; Tafuri *et al.*, 2001; Toplu; Aydogan, 2011).

Apesar da presença de lesões pulmonares compatíveis com a infecção por *Leishmania* spp., as formas amastigotas raramente são visualizadas no tecido pulmonar por meio da rotina usual de histopatologia e/ou citologia (Gonçalves *et al.*, 2018; Kavarnos *et al.*, 2022). Para tal, as técnicas de imunoistoquímica fornecem melhores resultados na detecção do parasito e, ainda, a possibilidade de indiciá-lo como a causa das lesões observadas (Paulino *et al.*, 2013).

1.7 O PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA INFECÇÃO POR *Leishmania* spp.

Na infecção por *Leishmania* spp., os macrófagos desempenham um papel duplo e controverso, pois, apesar de serem responsáveis pela destruição de parasitos fagocitados, também propiciam um local seguro para a sua proliferação. Sendo assim, estas células são as peças-chave para a progressão da doença, e a resposta imune resultante da interação entre o parasita e o hospedeiro determinará o sucesso ou falha da infecção (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018).

Quando em repouso, os macrófagos são tidos como “M0” ou macrófagos *naïve*. Porém, de acordo com o microambiente onde se encontram, podem receber sinais capazes de ativá-los, culminando na expressão de fenótipos funcionalmente distintos classificados em “M1” (via ativação clássica) e “M2” (via ativação alternativa), podendo interferir de forma positiva ou negativa no desfecho da doença (Arango Duque; Descoteaux, 2014; Cassetta; Cassol; Poli, 2011; Zanluqui; Wowk; Pinge-Filho, 2015). O fenótipo M2 é subclassificado, ainda, em M2a, M2b, M2c e M2d a depender da expressão e indução por moléculas específicas como IL-4 e IL-13 (M2a), estímulo por imunocomplexos na presença de um ligante do receptor *Toll-like* (M2b) e estímulo

anti-inflamatório por glicocorticóides, IL-10 e fator de crescimento transformador beta (M2c) (Cassetta; Cassol; Poli, 2011). O subtipo M2d, por sua vez, está relacionado com inibição da resposta imune e promoção de angiogênese (Wang *et al.*, 2010).

A ativação de macrófagos M1 é dada pela subpopulação de linfócitos Th1 e resulta no desencadeamento de uma explosão oxidativa capaz de eliminar o protozoário, a partir da produção de citocinas como interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Com a resposta mediada por Th1, as espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo superóxido e peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e óxido nítrico (NO), são produzidas de forma mais intensa pelas células hospedeiras e possuem alto potencial microbicida (Arango Duque; Descoteaux, 2014; Scott; Novais, 2016; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018).

A expressão do fenótipo M2 dos macrófagos, entretanto, é induzida por intermédio da resposta do tipo Th2 a partir de linfócitos ativados, com consequente produção e liberação de citocinas como IL-4 e IL-13. Este fenótipo é caracterizado pela biossíntese de poliaminas via ativação da enzima arginase-1 e produção de ureia e L-ornitina; estes compostos favorecem o crescimento e a sobrevivência do protozoário no interior dos macrófagos, além de alavancarem a progressão da doença (Muxel *et al.*, 2017; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018). Em humanos, a persistência de macrófagos M2 nos tecidos tem sido correlacionada à fibrose clínica e experimental pelo fato de apresentarem alta expressão da molécula FIZZ1, a qual está relacionada à ativação de fibroblastos e a diferenciação destes em miofibroblastos; a presença de arginase-1, ainda, observada na via de ativação alternativa de macrófagos M2, resulta na proliferação celular, deposição de colágeno e síntese de matriz extracelular, contribuindo para a fibrose (Grabarz, 2014; Trujillo *et al.*, 2008).

Um estudo feito por Moreira *et al.* (2016) correlacionou a alta carga parasitária com o predomínio de macrófagos M2 em órgãos de cães infectados naturalmente por *Leishmania infantum*, imunomarcados com CD163. Concluíram, portanto, que este fenótipo pode contribuir para a proliferação do parasita nos tecidos.

1.7.1 Imunomarcadores diagnósticos para macrófagos e seus subtipos na leishmaniose visceral

De acordo com Van Furth e Cohn (1968), os macrófagos são células imunológicas pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear (SFM), assim como os histiócitos, e estão presentes entre as células de primeira linha de defesa frente a doenças granulomatosas com a função de fagocitar e digerir antígenos. Todavia, diferentes distúrbios e doenças histiocíticas resultam na expressão de imunofenótipos diversificados e, conseqüentemente, na presença de linhagens celulares distintas dentro do SFM (Emile *et al.*, 2016; Moore, 2014). Dentro deste cenário, faz-se de grande valia a avaliação imunoistoquímica da proporção celular tecidual em um microambiente inflamatório; isso permite distinguir a população de macrófagos e seus subtipos de todo o infiltrado histiocítico, como ocorre, por exemplo, na infecção por *Leishmania infantum* (Lazzarini *et al.*, 2023).

A detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em cortes de tecidos caninos e humanos fixados e parafinizados por técnica de imunoistoquímica já foi descrita e é de amplo uso na rotina laboratorial (Bourdoiseau; Marshal, Magnol, 1997; Ferrer *et al.*, 1988; Livni *et al.*, 1983). Atualmente, o método de Tafuri *et al.* (2004) é o mais utilizado na medicina veterinária (Lazzarini *et al.*, 2023), e baseia-se na utilização do método imunoistoquímico da estreptoavidina peroxidase e soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* como anticorpo primário.

Adicionalmente, Lazzarini *et al.* (2023) propuseram uma combinação de protocolos imunoistoquímicos para detectar e diferenciar macrófagos e seus subtipos dentro do SFM, a partir do método de Tafuri *et al.* (2004) com modificações, utilizando os anticorpos anti-Iba-1, anti-MAC387 e anti-CD11b-CD68-CD163-CD14-CD16 em pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Tuon *et al.* (2009) estudaram o perfil imunoistoquímico do fenótipo celular inflamatório e citocinas em amostras pulmonares de pacientes com LV com anticorpos monoclonais, os quais incluíram anti-iCD4-CD8-CD20-CD68-CD57-IL-4/10-TNF-alfa/IFN-gama. Parisi *et al.* (2021) enfatiza que, pelo fato de o fenótipo M2 expressar intensamente CD204 e CD163 de um modo geral, ambos podem ser utilizados para diferenciar os fenótipos M1 e M2.

Mais recentemente, Kavarnos *et al.* (2022) utilizaram o anticorpo monoclonal de protease de superfície gp63 em biópsias de mucosa brônquica coletadas de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Entretanto, não há literatura disponível no que diz respeito ao estudo imunoistoquímico do perfil fenotípico de macrófagos em tecido pulmonar de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

1.8 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença infecciosa multissistêmica de caráter zoonótico, causada por um protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, sendo o cão doméstico o principal reservatório do agente. No Brasil, a espécie responsável pela doença é a *Leishmania infantum*. Nos pulmões, o acometimento pelo agente resulta em pneumonia intersticial crônica difusa. O presente estudo proposto justifica-se em virtude da escassez de literatura científica voltada à caracterização histopatológica e imunoistoquímica das lesões pulmonares inflamatórias em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, bem como em relação ao mecanismo de persistência da lesão em cães com baixa carga parasitária.

1.9 OBJETIVOS

Analisar, caracterizar e quantificar as alterações histopatológicas pulmonares inflamatórias em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* com emprego de técnicas imunoistoquímicas e colorações especiais, bem como o estudo da expressão do fenotípica dos macrófagos pulmonares presentes na infecção e sua correlação com as lesões encontradas. É nossa hipótese que as lesões pulmonares inflamatórias estejam presentes e sejam persistentes mesmo em cães com baixa carga parasitária e sem sintomatologia clínica respiratória.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS SELECIONADOS PARA O ESTUDO

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética, Processo FOA 523-2023 (Anexo A). Para este estudo foram avaliados 62 cães com diagnóstico de leishmaniose visceral atendidos na rotina do Hospital Veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira da FMVA-UNESP e no Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba-SP, sem predileção por raça, sexo e idade, que vieram a óbito e/ou foram eutanasiados em decorrência de LVC comprovada por métodos diagnósticos sorológicos e/ou parasitológico direto, com presença ou não de sintomatologia clínica respiratória. O grupo controle (n=5) incluiu animais saudáveis e negativos para *Leishmania infantum* pelos mesmos métodos diagnósticos supracitados, sem sintomatologia clínica respiratória e ausência de lesões pulmonares macro e microscópicas.

Os animais foram divididos em dois grupos distintos, sendo o grupo 1 (G1) composto por animais naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (n=62) e o grupo 2 (G2), composto por animais-controle (n=5).

2.2 COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

2.2.1 Análises hematológicas e bioquímicas

Durante o procedimento de eutanásia foram colhidas amostras de sangue da veia jugular em tubos com EDTA e sem anticoagulante para análises hematológicas (hemograma completo) e de bioquímica sérica avaliar função hepática, função renal e proteínas séricas; nestes dois últimos, sobretudo, para fins de estadiamento clínico (EC) dos animais incluídos no estudo de acordo com o proposto por Brasileish Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal (2018). Os analitos mensurados foram alanina aminotransferase (ALT) aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina, albumina e globulina.

2.2.2 Análise histopatológica

As amostras de pulmão foram colhidas durante o procedimento de necropsia convencional. Ao menos duas amostras de lobos pulmonares aleatórios, com ou sem alterações macroscópicas foram colhidas, fixadas em formol 10% tamponado (pH 7,2-7,4) para processamento histopatológico.

A quantificação do processo inflamatório foi aplicada uma escala de escore de inflamação (EI) de 0 a 3 para designar o processo inflamatório como ausente (0), discreto (1), moderado (2) e acentuado (3). Para fibrose intersticial foi aplicada uma escala de 0 a 2, onde 0 = ausente, 1 = discreto e 2 = acentuado (Duarte; Corbett, 1984). Para pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp. e a quantificação das mesmas foi realizada imunoistoquímica seguindo método descrito por Tafuri *et al.* (2004). Os dados obtidos foram avaliados e expressos em forma de porcentagem, fotomicrografias e gráficos de dispersão.

2.2.3 Reação imunoistoquímica

As amostras de tecido pulmonar dos grupos (G1 e G2) foram submetidas à técnica de imunoistoquímica para detecção de células T (anti-CD3+ pronto para uso, Dako), macrófagos (anti-RCA-1, Vector), macrófagos M2 polarizados (anti-CD204, Invitrogen) e formas amastigotas de *Leishmania infantum* através do uso de soro hiperimune de camundongo infectado, cedido gentilmente pela Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti (Laboratório de Patologia de Moléstias infecciosas, FM-USP). No G1, a técnica foi empregada apenas nos pulmões onde foram constatadas alterações inflamatórias microscópicas em cortes corados previamente com hematoxilina e eosina (HE). A técnica de imunoistoquímica foi feita de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (tabela 1).

Tabela 1 - Anticorpos primários e suas respectivas diluições, método de recuperação antigênica e cromógeno utilizados no método imunoistoquímico.

Anticorpo	Recuperação antigênica	Substrato cromógeno	Diluição
Anti-CD3 (A0452, Dako)	Tris EDTA, 110°C por 12 min em panela de pressão	3,3'-diaminobenzidine (K3468, Dako)	1:100
Anti-RCA-1 (B-1085-1, Vector)	Tris EDTA, 110°C por 12 min em panela de pressão	3,3'-diaminobenzidine (K3468, Dako)	1:100
Anti-CD204 (MA5-29733, Invitrogen)	Tris EDTA, 110°C por 12 min em panela de pressão	3,3'-diaminobenzidine (K3468, Dako)	1:200
Soro hiperimune de camundongo	Tris EDTA, 110°C por 12 min em panela de pressão	3,3'-diaminobenzidine (K3468, Dako)	1:1000

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os controles positivos utilizados foram tonsila humana, tecido linfoide (baço e linfonodos superficiais [poplíteos e pré-escapulares]) de cães com LV, micróglia de cães com encefalite por cinomose e fígado de cães com LV. Para controle negativo foram utilizados os mesmos cortes histológicos aplicados aos positivos, porém com omissão do anticorpo primário.

As imagens da microscopia avaliadas foram obtidas com aumento de 400x (n=10 campos/corte histológico), e as células imunomarcadas no interstício pulmonar contadas manualmente com auxílio do software Image J 1.52^a.

2.2.4 Análise estatística

Para avaliar a contagem das células foi utilizado cálculo de média ($\bar{x}$). Foi utilizado o teste de correlação de Spearman para investigar a possível correlação do escore de inflamação com o estadiamento clínico e a quantificação de células

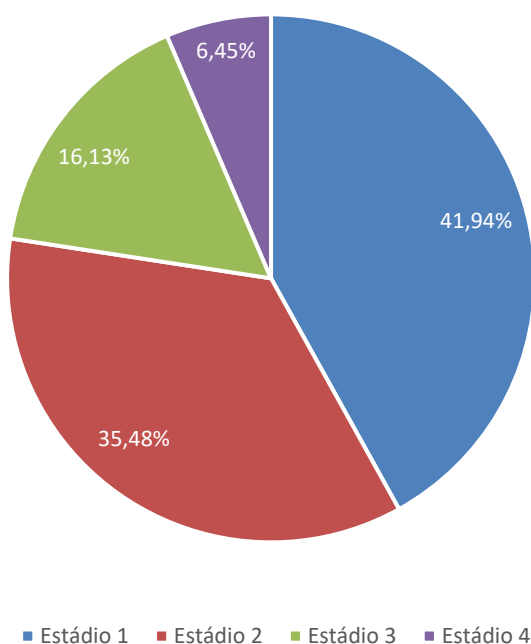
imunomarcadas com a presença ou não de formas amastigotas no tecido pulmonar. Quando obtidos valores de $p < 0,05$, os resultados foram considerados estatisticamente significativos. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 10.2.3 para Windows (Boston, Massachusetts, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 ESTADIAMENTO CLÍNICO

Os animais do grupo infectado (n=62) foram classificados com estadiamento clínico (EC) 1 (sem sinais clínicos) (43,54%; n=27), 2 (sem sinais clínicos/dinais clínicos discretos) (33,87%; n=21), 3 (sinais clínicos moderados) (16,12%; n=10) e 4 (sinais clínicos graves) (6,45%; n=4) (Fig.1). No exame externo de cães com EC 2, 3 e 4 as lesões predominantes foram linfadenomegalia generalizada, emagrecimento moderado a acentuado, onicogribose, blefarite e/ou ceratoconjuntivite e alterações cutâneas como alopecia, úlceras e dermatite esfoliativa multifocais e/ou difusas.

Figura 1 – Gráfico de estadiamento clínico dos animais do grupo infectado (G1).



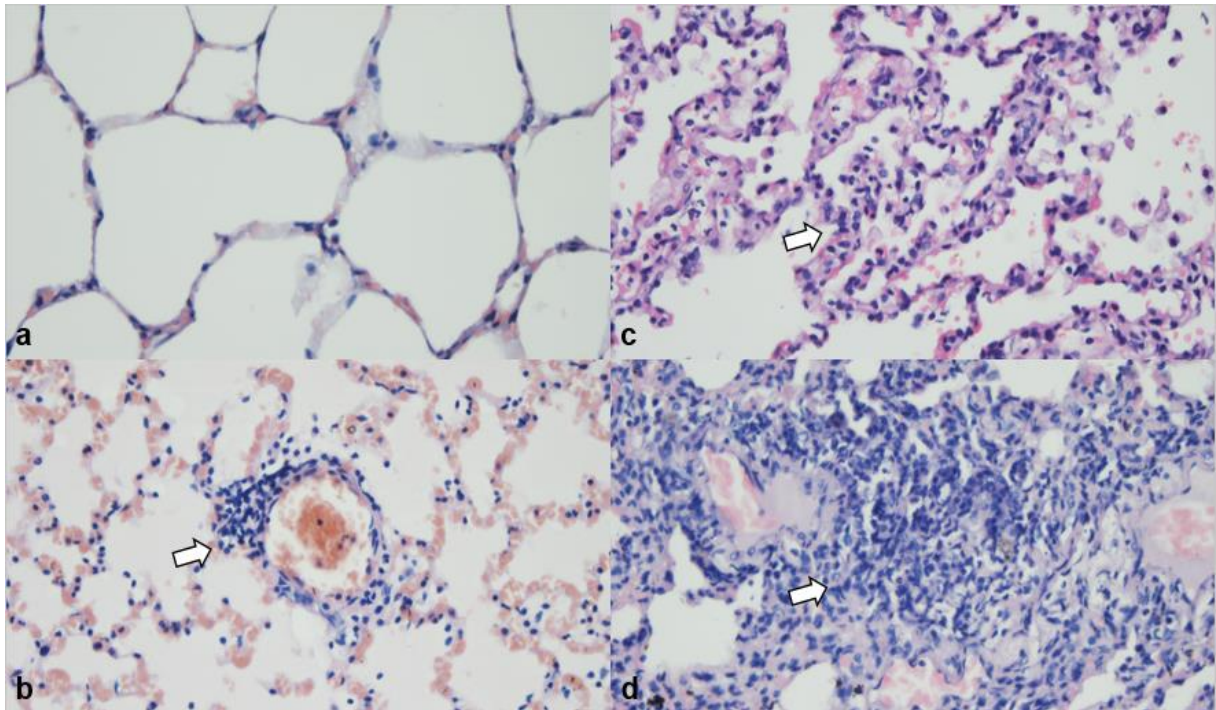
Fonte: Elaborado pelo autor.

As alterações hematológicas observadas foram anemia (66,1%; n=41), linfopenia (35,48%; n=22), leucocitose (22,5%; n=14), trombocitopenia (22,5%; n=14). Na análise bioquímica as alterações foram hiperproteinemia (59,67%; n=37), hipoalbuminemia (50%; n=31) e azotemia (11,2%; n=7).

3.2 ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS PULMONARES

Microscopicamente o processo inflamatório era composto predominantemente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, sendo observado em 17/62 animais do G1 (27,41%). A presença e intensidade da inflamação foi classificada como ausente em 45 cães (72,58%) do número total de animais constituintes do G1. Dentre os 17 cães com alterações inflamatórias, o EI foi classificado como discreto em 5 (29,41%), moderada em 9 (52,94%) e acentuada em 3 (17,64%) (Fig. 2). Nos pulmões com EI 2, o infiltrado inflamatório encontrava-se distribuído principalmente nas regiões perivasculares, peribronquiolares, peribrônquicas e focos aleatórios do interstício alveolar (Fig. 3b, c e d). Foi observada, ainda, broncopneumonia supurativa em 1 cão (5,88%) composta por infiltrado inflamatório neutrofílico obliterando lúmen alveolar, brônquico e bronquiolar. A fibrose intersticial foi classificada como discreta (escala 1) e identificada com coloração especial de tricrômico de Masson em 1 dos 17 cães com alterações inflamatórias (5,88%) apresentando EC e EI 2, situada no interstício alveolar junto a infiltrado inflamatório linfohistioplasmocítico moderado (Fig. 4); não houve significância estatística na correlação com o EC e o EI dos animais G1 estudados ($p= 0,8117$ e $p= >0,9999$, respectivamente). Congestão (77,4%; $n=48$) e edema (48,3%; $n=30$) foram as alterações predominantes observadas em todas as amostras analisadas do G1, com ou sem presença de inflamação concomitante (Fig.3a).

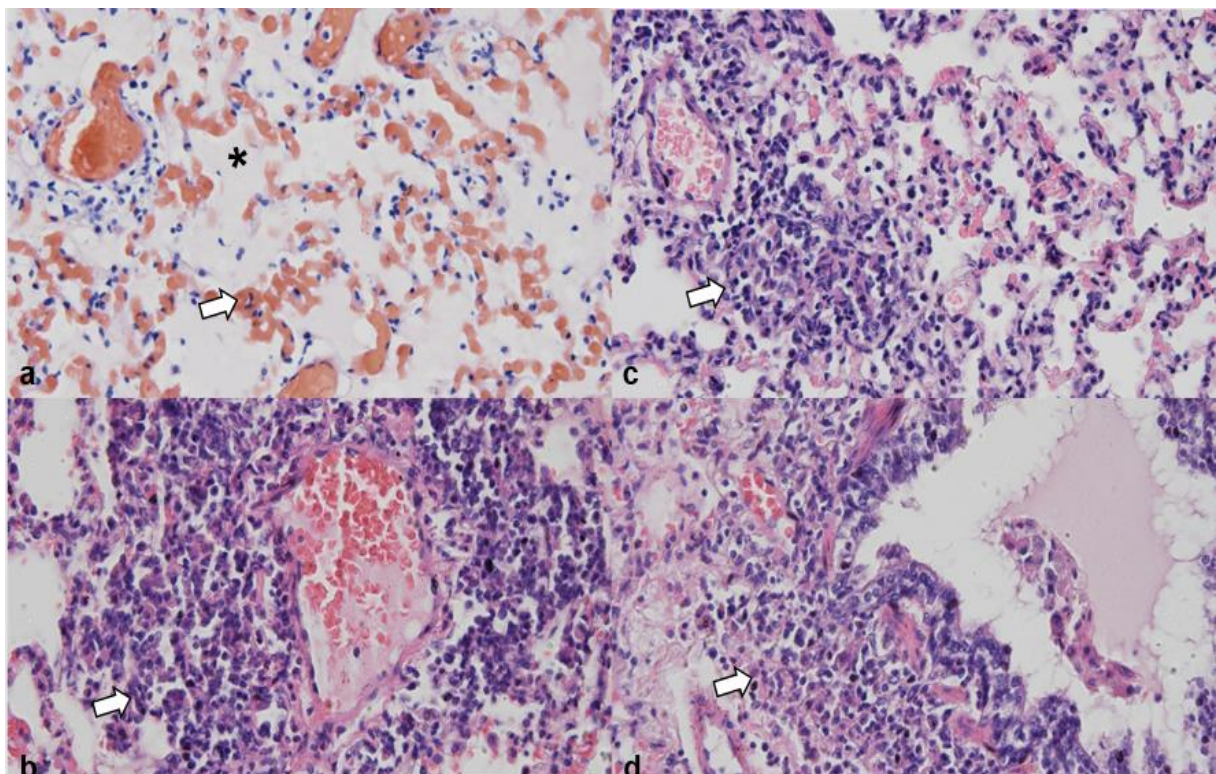
Figura 2 - Leishmaniose visceral canina, pulmões, cães do grupo G1 e G2 (HE, 400x).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Ausência de inflamação (G2); (B) Notar infiltrado inflamatório mononuclear perivascular discreto (seta branca); (C) Notar espessamento difuso moderado de septos alveolares por infiltrado inflamatório mononuclear (seta branca); (D) Notar espessamento difuso acentuado de septos alveolares por infiltrado inflamatório mononuclear (seta branca).

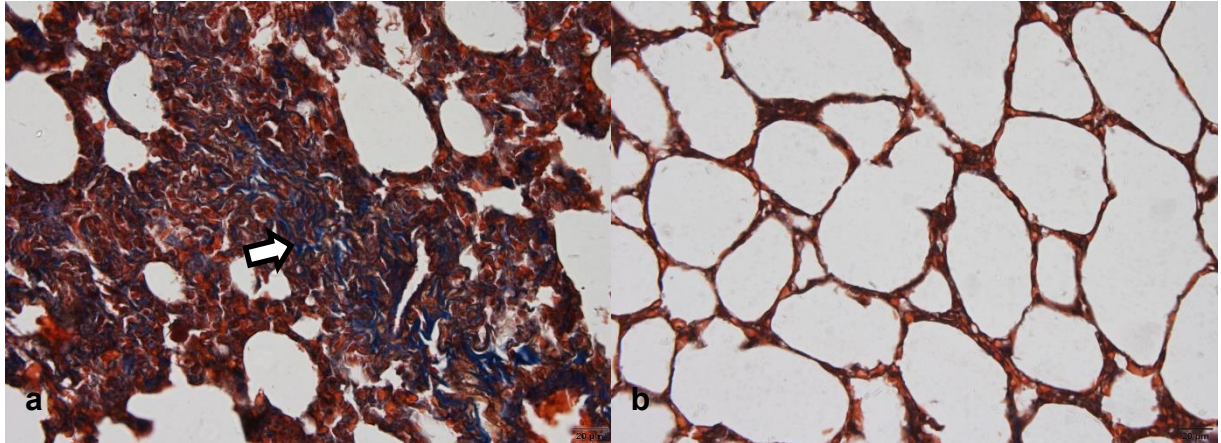
Figura 3 - Leishmaniose visceral canina, pulmões, cães do grupo G1 (HE, 400x).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Notar edema (asterisco) e congestão (seta) difusos no interstício pulmonar; (B) Notar infiltrado inflamatório mononuclear perivascular (seta); (C) Notar espessamento difuso de septos alveolares por infiltrado inflamatório mononuclear (seta); (D) Notar infiltrado inflamatório mononuclear peribronquiolar (seta).

Figura 4 - Leishmaniose visceral canina, pulmões, cães dos grupos G1 e G2 (Tricrômico de Masson, 400x)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Espessamento focal discreto da parede alveolar decorrente da deposição de colágeno no interstício (seta); (B) Notar morfologia normal da parede alveolar em pulmão de cão do grupo controle (B).

Células com morfologia de macrófago foram observadas nas regiões peribrônquicas, peribronquiolares, septos alveolares e no lúmen alveolar independentemente da observação de inflamatório concomitante, mas em maior número nos pulmões com pneumonia intersticial de EI 2 e 3. De acordo com as alterações observadas, o processo inflamatório pulmonar foi classificado como do tipo celular (Duarte *et al.*, 1986).

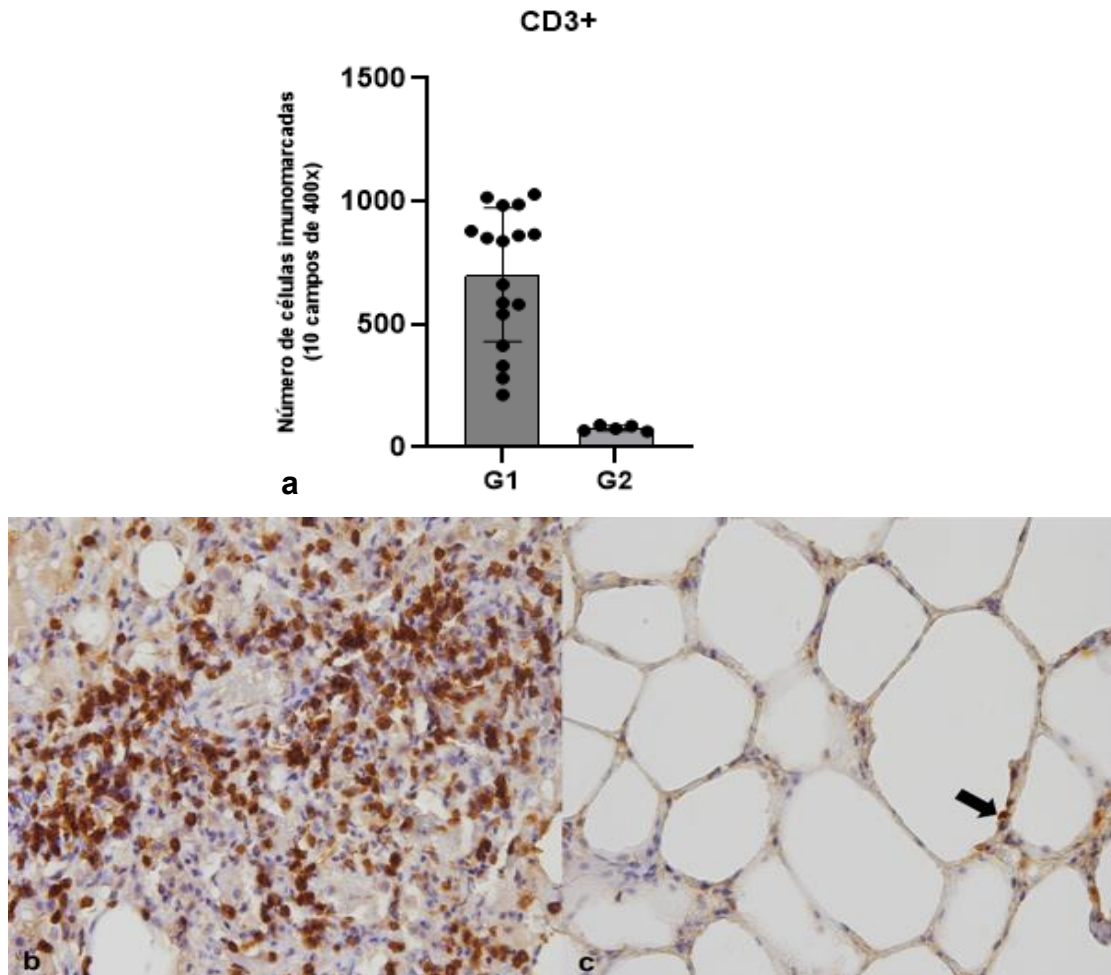
3.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Foi observada imunorreatividade celular citoplasmática para CD3+ e RCA-1 em todas as amostras analisadas de ambos os grupos (G1 e G2).

Nos animais G1 foi observada imunomarcção intensa de linfócitos TCD3+ no interstício pulmonar, com significativa diferença entre os pulmões de EI 1 e EI 3, com $\bar{x}$ de 250 e 1.002,75 células em 10 campos ($p=0,0001$), respectivamente. O interstício dos pulmões-controle dos animais G2 apresentaram $\bar{x}$ de 77,2 células (Fig. 5a). No

quesito de correlação entre a quantidade de células marcadas e o EC dos animais G1, não houve significância estatística ($p=0,1141$) (Fig. 8).

Figura 5 - Gráfico de dispersão e imunoistoquímica (IHQ, 400x) de linfócitos TCD3+ em pulmões de cães dos grupos G1 e G2.



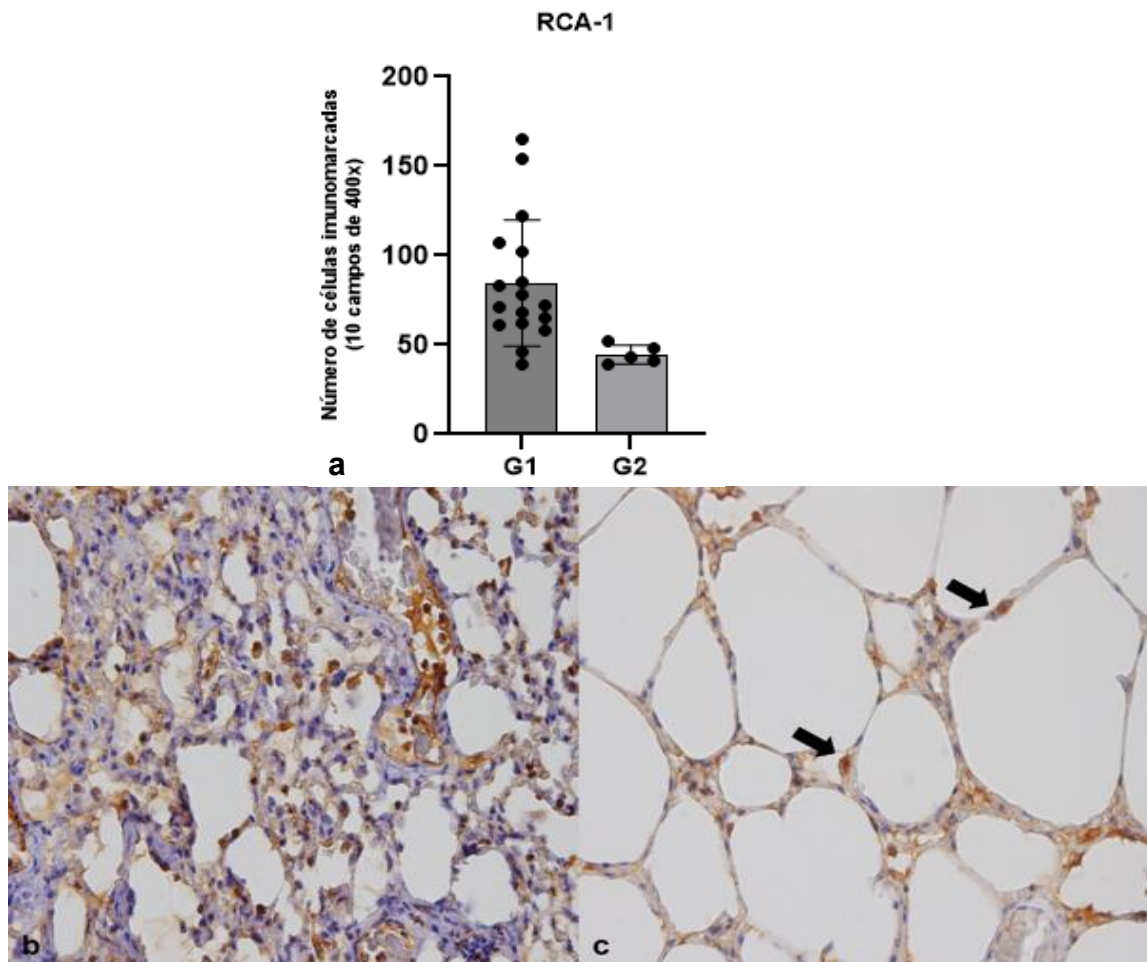
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Gráfico de dispersão demonstrando a quantificação linfócitos TCD3+ imunomarcados em cães dos grupos G1 e G2; (B) Linfócitos TCD3+ imunomarcados em quantidade moderada. Imunoistoquímica; (C) Linfócitos TCD3+ imunomarcados em pulmão-controle (setas).

A imunomarcagem de macrófagos nos animais G1 com EI 2 e EI 3 variou com $\bar{x}$ de 122 células em 10 campos; os pulmões de EI 1 obtiveram $\bar{x}$ de 60,8 células ($p=0,0225$). Os pulmões-controle (G2) apresentaram $\bar{x}$ de 44,6 células (Fig. 6). As células estavam dispostas em maior número no interstício pulmonar, sobretudo compondo o infiltrado inflamatório em menor proporção quando comparadas à quantidade de linfócitos TCD3+ ($p=0,0022$) (Fig. 7). No quesito de correlação entre a

quantidade de células marcadas e o EC dos animais G1, não houve significância estatística ($p=0,0656$) (Fig. 8).

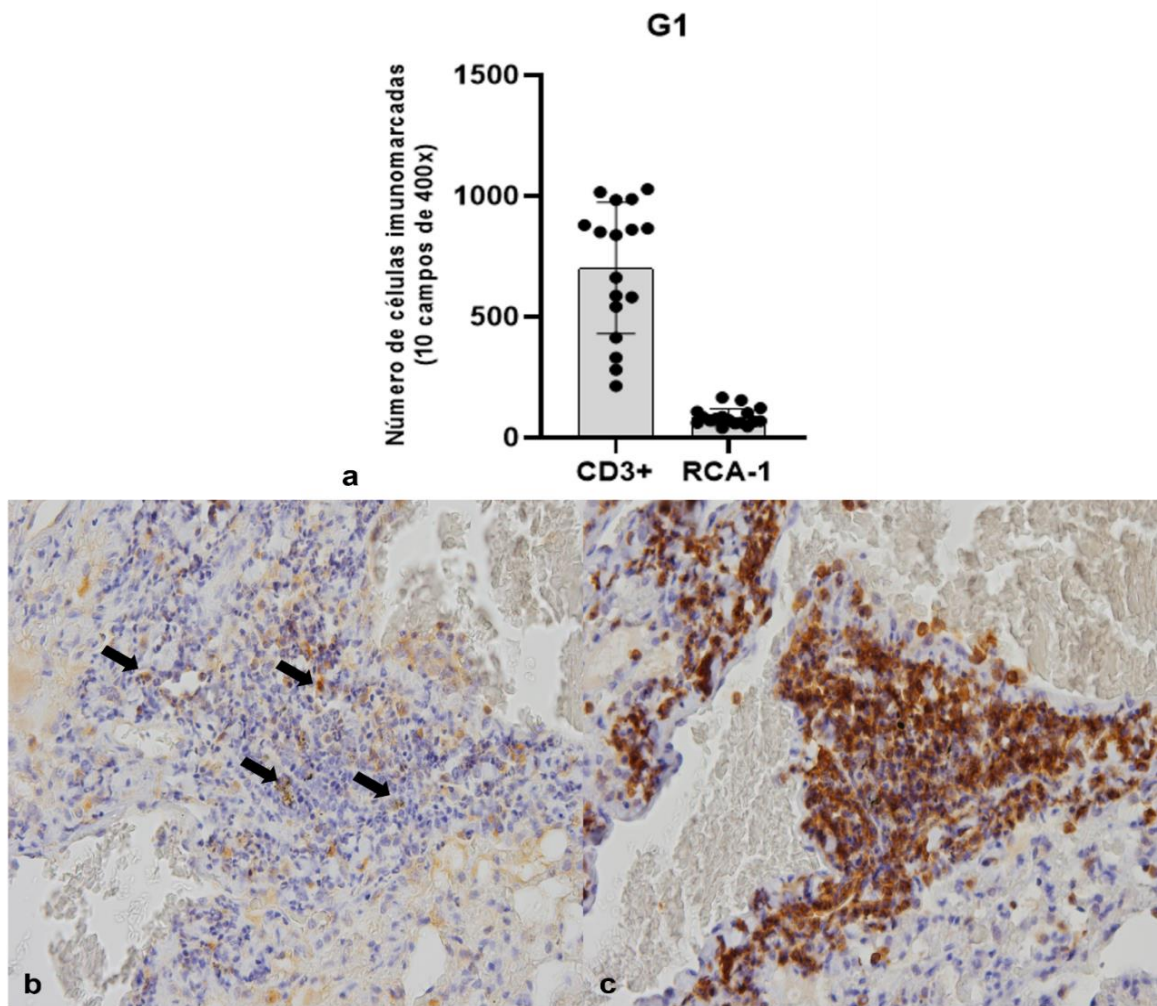
Figura 6 - Gráfico de dispersão e imunoistoquímica de macrófagos RCA-1 positivos no interstício pulmonar de cães dos grupos G1 e G2 (IHQ, 400x).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Gráfico de dispersão demonstrando a quantificação de células contadas em ambos os grupos; (B) Macrófagos imunomarcados nos septos alveolares em quantidade moderada. Imunoistoquímica; (C) Macrófagos imunomarcados nos septos alveolares de pulmão-controle (setas).

Figura 7 - Gráfico de dispersão e imunoistoquímica de linfócitos TCD3+ e macrófagos RCA-1 positivos em pulmão de cães do grupo G1 (IHQ, 400x).

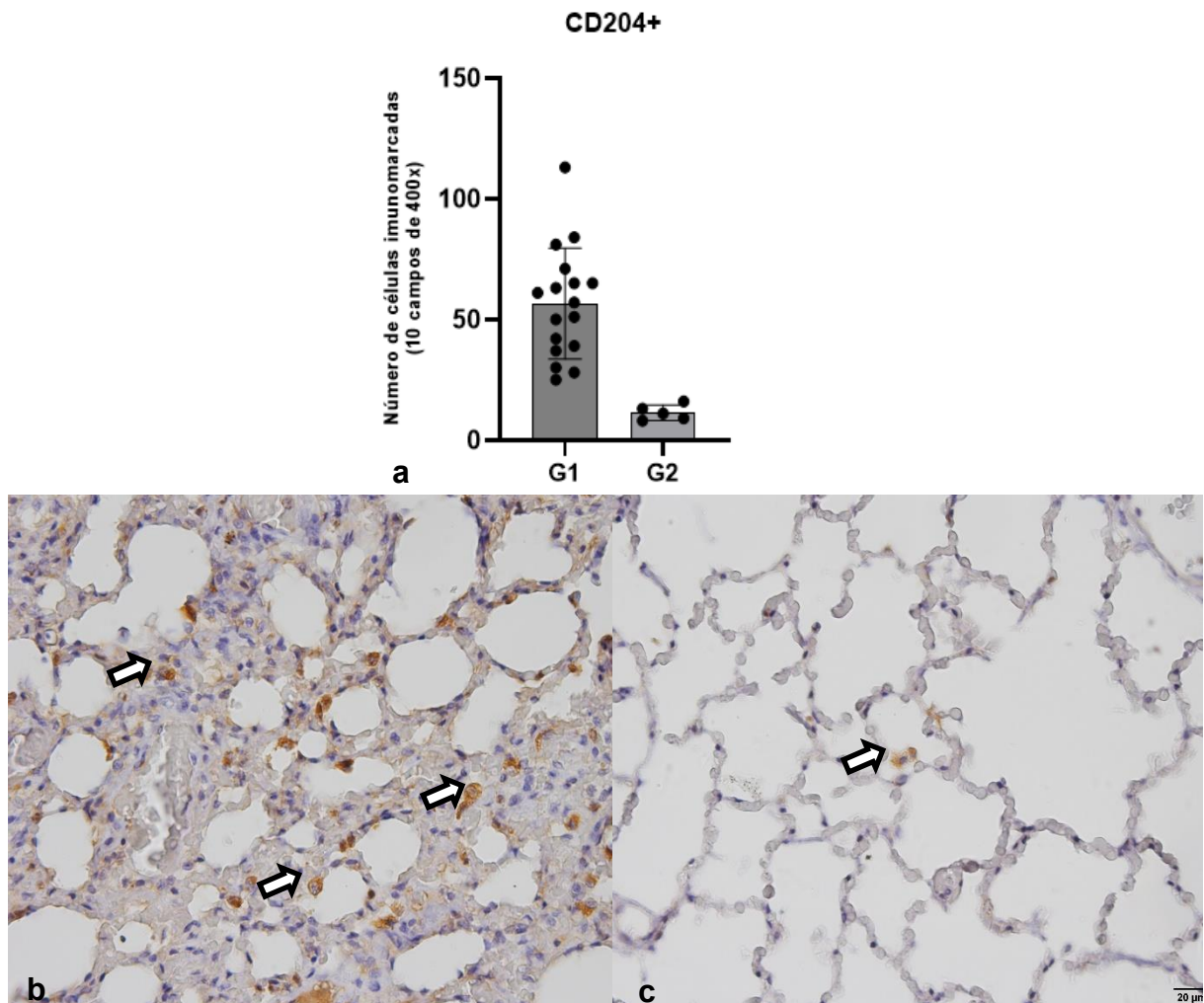


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Gráfico de dispersão demonstrando a quantificação de macrófagos e linfócitos TCD3+ imunomarcados em cães G1. Imunoistoquímica (IHQ); (B) Macrófagos imunomarcados em região perivascular (setas); (C) Linfócitos TCD3+ imunomarcados em região perivascular.

A imunorreatividade de macrófagos M2 CD204 positivos nos animais G1 de EI 2 e EI 3 revelou $\bar{x}$ de 67,2 e 61,7 células em 10 campos, respectivamente, sendo maior que a metade da média identificada na quantidade de células RCA-1 positivas nos pulmões com o mesmo EI ($p < 0,0001$); o interstício pulmonar dos animais com EI 1 apresentou, por sua vez, $\bar{x}$ de 24,8 células. Já os animais G2 corresponderam a $\bar{x}$ de 8,8 células (Fig. 8). No quesito de correlação entre a quantidade de células marcadas e o EC dos animais G1, não houve significância estatística ($p = 0,1989$); foi identificada significância estatística quando correlacionada com o EI dos animais G1 ($p = 0,0239$) (Fig.9).

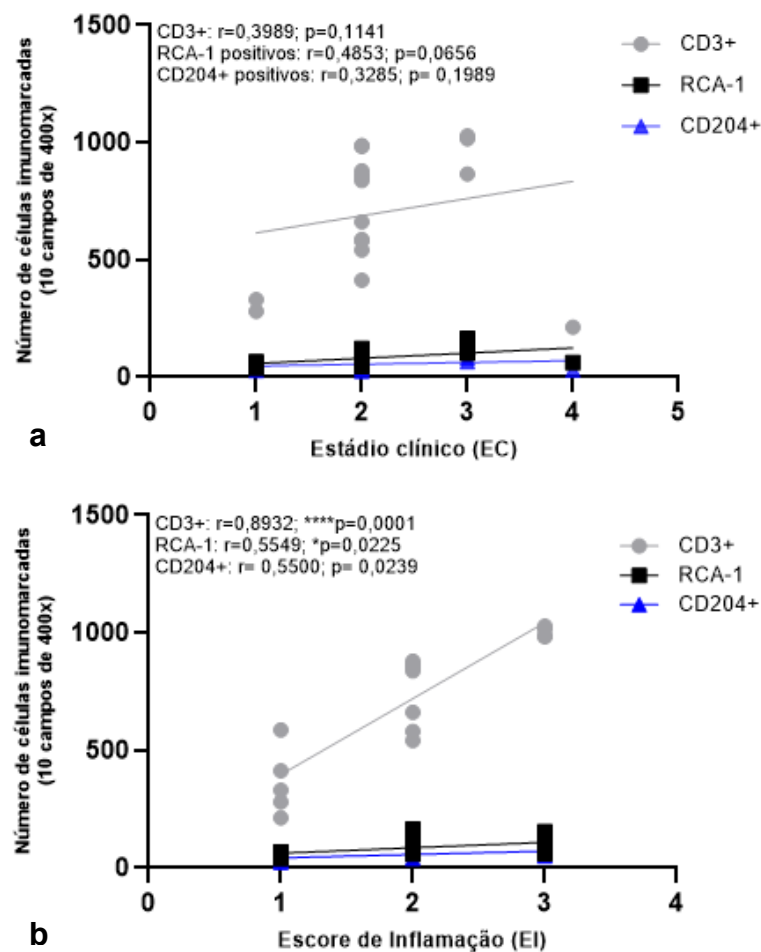
Figura 8 - Gráfico de dispersão e imunoistoquímica (IHQ, 400x) de macrófagos CD204 positivos no interstício pulmonar de cães dos grupos G1 e G2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Gráfico de dispersão demonstrando a quantificação de células contadas em ambos os grupos; (B) Macrófagos imunomarcados nos septos alveolares (setas); (C) Macrófagos imunomarcados nos septos alveolares de pulmão-controle (seta).

Figura 9 - Gráficos de dispersão demonstrando a quantidade e a correlação de macrófagos RCA-1 e CD204 positivos e linfócitos TCD3+ imunomarcados de acordo com o estágio clínico (EC) e o escore de inflamação (EI) de cães G1.

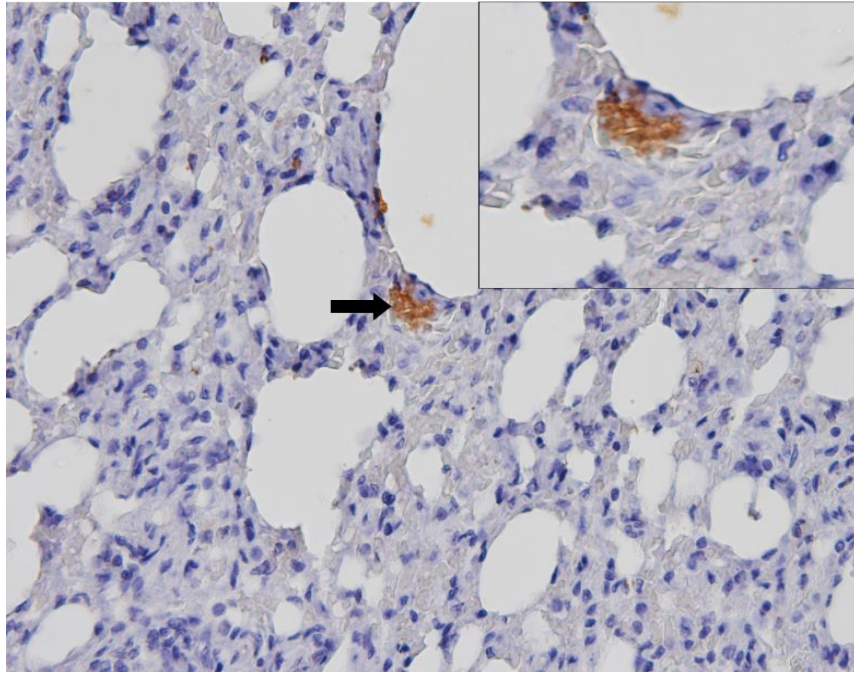


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Correlação negativa entre a quantidade de células e o EC (linfócitos TCD3+: $r=0,3989$; $p=0,1141$; macrófagos RCA-1 positivos: $r=0,4853$; $p=0,0656$; macrófagos CD204 positivos: $r=0,3285$; $p=0,1989$); (B) Correlação positiva entre a quantidade de células contadas e o EI (linfócitos TCD3+: $r=0,8932$; $****p=0,0001$; macrófagos RCA-1 positivos: $r=0,5549$; $*p=0,0225$; macrófagos CD204 positivos: $r=0,5500$; $p=0,0239$).

Formas amastigotas de *Leishmania* spp. foram visualizadas em 11,7% ($n=2/17$) dos cães G1 em pulmões de EI 2 e 3 e EC 2, situadas no interstício alveolar em quantidade discreta (Fig. 10). Não houve correlação entre a quantidade de formas amastigotas e a intensidade do processo inflamatório ($p=0,7275$), bem como com o estadiamento clínico ($p=0,2739$).

Figura 10 - Detecção imunoistoquímica de formas amastigotas, pulmão, cão com LVC (IHQ, 400x).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: notar presença de amastigotas em parede alveolar (seta).

4 DISCUSSÃO

A avaliação histopatológica revelou presença de infiltrado inflamatório linfohistioplasmocítico no interstício pulmonar composto, em maior parte, por linfócitos e plasmócitos, assim como descrito em estudos anteriores (Alves *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 1986; Gonçalves *et al.*, 2003; Kavarnos *et al.*, 2022; Magalhães *et al.*, 2016; Paulino *et al.*, 2013; Tafuri *et al.*, 2001; Toplu; Aydogan, 2011).

Congestão foi observada em 77,4% (48/62) dos pulmões avaliados. A congestão observada nos pulmões dos animais na ausência de processo inflamatório e cardiomiopatia é questionável, uma vez que a eutanásia química dos animais foi feita com o uso de barbitúricos (tiopental) (Zachary, 2023). Os baixos níveis séricos de albumina identificados em 50% (n=31) dos cães, junto à azotemia (11,2%), são os mais prováveis agentes causais do edema pulmonar observado em 48,3% (30/62) dos pulmões analisados com ausência de pneumonia, visto que, na LVC, a hipoalbuminemia está presente independente da sintomatologia apresentada ou não pelos cães (Castro *et al.*, 2012), a depender do estadiamento clínico (Brasileish Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal, 2018). A doença renal na LVC é comum e decorrente do depósito de imunocomplexos teciduais (Birchard; Sherding, 2003; Rocha *et al.*, 2022), podendo resultar na redução da eliminação de sódio pelos rins e acúmulo de líquido intersticial (Zachary, 2023).

A pesquisa imunoistoquímica de linfócitos TCD3+ e macrófagos RCA-1 e CD204 positivos no tecido pulmonar revelou predomínio de linfócitos TCD3+, que varia significativamente em quantidade de acordo com escore de inflamação. Os macrófagos CD204 positivos de fenótipo M2 corresponderam, em média, a 63,39% do total de macrófagos RCA-1 positivos presentes no interstício pulmonar dos cães G1, demonstrando, portanto, um maior predomínio deste subtipo. Macrófagos M2 polarizados também foram predominantes em lesões cutâneas na leishmaniose tegumentar americana (Pereira, 2018). A presença do fenótipo M2 macrofágico mantém um ambiente anti-inflamatório característico que previne uma resposta imune Th1 contra a *Leishmania* através de vários mecanismos efetores, como secreção de IL-10 e expressão diminuída de MHC II. Tais mecanismos limitam a capacidade de apresentar antígenos e contribuem para a sobrevivência do protozoário (Almeida *et al.*, 2023).

Estudos imunoistoquímicos em pulmões de seres humanos com LV por meio da contagem de células imunomarcadas já foi relatado (Tuon *et al.*, 2009). Foi identificada maior quantidade de células T intersticiais com poucos macrófagos, e classificaram a resposta imune como do tipo Th2. A resposta Th2 observada em pulmões de humanos é a mesma que ocorre sistemicamente em cães sintomáticos (Freitas *et al.*, 2022), com padrão de resposta imune humoral à *Leishmania* spp. com produção de anticorpos. Tal resposta está relacionada com a progressão da doença e manifestações sistêmicas, em virtude da produção e manutenção de um microambiente inflamatório dado por uma dinâmica complexa de citocinas e interleucinas a depender de uma resposta imunológica altamente reativa vista na infecção por *Leishmania* spp. (Oliveira *et al.*, 2021). Adicionalmente, Mathias *et al.* (2001) correlacionaram a patogênese do processo inflamatório nos pulmões com a presença de detritos celulares, antígenos e depósitos de imunoglobulina G (IgG) em estudos realizados em pulmões de hamsters infectados por *Leishmania* spp. Os depósitos de IgG foram identificados com auxílio de imunoistoquímica na parede dos capilares com intensidade variável de acordo com o tempo de infecção; tendo em vista que as alterações pulmonares não dependiam, portanto, unicamente do parasitismo tecidual, os autores sugeriram sua participação na patogênese do processo inflamatório pulmonar. Costa (2009) sugere que, em seres humanos, os pulmões podem ser um dos alvos de uma resposta inflamatória sistêmica na LV, caracterizada por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e das proteínas da fase aguda da inflamação, as quais promovem, além de alterações inflamatórias, distúrbios de coagulação. Devido ao caráter sistêmico e crônico da leishmaniose visceral observado também em cães, podemos considerar a hipótese de que as alterações pulmonares na infecção natural por *Leishmania* spp. podem ser resultantes do processo inflamatório sistêmico crônico, mediado por citocinas e interleucinas pró-inflamatórias produzidas por células do sistema imune, sobretudo células T e macrófagos (Ansari; Saluja; Salotra, 2006; Caldas *et al.*, 2005; Nylen *et al.*, 2007; Peruhype-Magalhaes *et al.*, 2006; Weigand *et al.*, 2004), e a um padrão de resposta imune humoral (Th2) sistêmica mediada pela produção de anticorpos e imunocomplexos (Mathias *et al.*, 2001).

O baixo percentual de fibrose intersticial identificado nos animais com alterações inflamatórias do G1 deste estudo (5,88%; n=1/17) se contrapõe aos encontrados na literatura em cães (Kavarnos *et al.*, 2022; Magalhães *et al.*, 2016), onde não houve o estudo da plasticidade macrofágica. Em suma, a presença de macrófagos na resposta cicatricial, sobretudo o fenótipo M2, resulta na produção e secreção de substâncias pró-fibróticas (Grabarz, 2014; Trujillo *et al.*, 2008). As células M2, especificamente as de subtipo M2c (Cassetta; Cassol; Poli, 2011), promovem a produção de colágeno e, finalmente, a fibrose por meio do recrutamento e ativação de fibroblastos mediados pelo fator de crescimento transformador (TGF- β). Entretanto, o exacerbado intermédio da IL-10, presente na resposta imune Th2 de cães com LVC (Corrêa *et al.* 2007; Rosário *et al.*, 2018), possui ação anti-inflamatória e antifibrótica (Salim; Xavier, 2014; Steen *et al.*, 2020). Em pulmões de humanos com fibrose pulmonar idiopática (FPI) foi demonstrado que a IL-10 suprime o desenvolvimento de fibrose pulmonar de maneira dependente de TGF- β 1, em que a produção desta por macrófagos alveolares foi suprimida pela ação da IL-10 (Spight *et al.*, 2005). São necessários mais estudos em pulmões de cães com LVC para melhor compreensão do mecanismo da resposta fibrótica, seja ela anti ou pró. Devemos salientar, ainda, a possível influência destes achados em virtude da eutanásia precoce dos animais no momento do diagnóstico.

Foram observadas formas amastigotas no citoplasma de macrófagos alveolares em 11,7% dos cães infectados (2/17) em pulmões de EI 2 e 3 e EC 2, não havendo correlação entre o parasitismo pulmonar com a intensidade do processo inflamatório ($p=0,7275$) e o estadiamento clínico ($p=0,2739$). Magalhães *et al.* (2016), entretanto, correlacionaram positivamente a intensidade das manifestações clínicas dos animais estudados com o parasitismo nos pulmões e a intensidade do processo inflamatório. A presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. no tecido pulmonar é raramente observada por meio de técnicas convencionais de histopatologia (Alves *et al.*, 2010; Duarte; Corbett, 1984). Com a técnica de imunoistoquímica, a presença do parasito nos pulmões de cães é identificada em 20% dos casos em média (Duarte *et al.*, 1986; Silva, L. *et al.*, 2013).

5 CONCLUSÃO

As alterações inflamatórias pulmonares em cães com LVC estão presentes e, quando ocorrem, independem do parasitismo no tecido e do estadiamento clínico dos animais.

A inflamação no interstício pulmonar de cães com LVC é crônica e do tipo linfohistioplasmocítica, com predomínio de linfócitos TCD3⁺ e menor número de macrófagos RCA-1. Dentro da população total de macrófagos pulmonares houve o predomínio de fenótipo CD204 positivo, que é característico de macrófagos com perfil M2.

O predomínio de macrófagos de fenótipo M2 indica se tratar de uma resposta Th2 que pode contribuir com a progressão da doença no tecido pulmonar.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição e habitats. *In*: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 207-255.
- ALBUQUERQUE, A. L. H.; LANGONI, H. A prática do tratamento na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em clínicas veterinárias, cuidados e protocolos. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 25, n. 1, p. 132-141, 2018. DOI:10.35172/rvz.2018.v25.23.
- ALESSI, A. C.; SANTOS, R. L. **Patologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2023. 1008 p.
- ALMEIDA, F. S.; VANDERLEY, S. E. R.; COMBERLANG, F. C.; ANDRADE, A. G.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; SILVA, E. S.; PALMEIRA, P. H. S.; AMARAL, I. P. G.; KEESSEN, T. S. L. Leishmaniasis: immune cells crosstalk in macrophage polarization. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, Basel, v. 8, n. 5 art. 276, p. 1-22, 2023. DOI: 10.3390/tropicalmed8050276.
- ALVES, G. B. B.; PINHO, F. A.; SILVA, S. M. M. S.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, F. A. L. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 3, p. 310-315, 2010.
- ALVAR, J.; ALVES, F.; BUCHETON, B.; BURROWS, L.; BÜSCHER, P.; CARRILLO, E.; FELGER, I.; HÜBNER, M. P.; MORENO, J.; PINAZO, M. J.; RIBEIRO, I.; SOSA-ESTANI, S.; SPECHT, S.; TARRAL, A.; WOURGAFT, N. S.; BILBE, G. Implications of asymptomatic infection for the natural history of selected parasitic tropical diseases. **Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 42, n. 3, p. 231-246, 2020. DOI: 10.1007/s00281-020-00796-y.
- ANDRADE, Z. A. Pneumonite intersticial no calazar = Interstitial pneumonitis in kala-azar. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 3, p. 371-381, 1959.
- ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 119, n. 3, p. 339-345, 2006. DOI: 10.1016/j.clim.2006.01.017.
- ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 5, art. 491, p. 1-12, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00491.
- AVERY, G. B.; FLECHER, M. A.; MACDONALD, M. G. **Neotatologia**: fisiopatologia e tratamento do recém-nascido. 4. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 1516 p.

ÁVILA, M. M.; BRILHANTE, A. F.; SOUZA, C. F.; BEVILACQUA, P. D.; GALATI, E. A. B.; BRAZIL, R. P. Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. **Parasites and Vectors**, London, v. 11, art. 64, p. 1-12, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2641-y.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 499-520.

BIRCHARD S.J; SHERDING R.G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais**. São Paulo, Roca. 2003, p.1015-1018.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 9, n. 4, p. 439-440, 1997. DOI: 10.1177/104063879700900421.

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017.

BRASILEISH GRUPO DE ESTUDO EM LEISHMANIOSE ANIMAL. **Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da Leishmaniose Canina**. [S.l.], 2018. 16 p.

BRAZIL, R. P.; RODRIGUES, A. A. F.; ANDRADE FILHO, J. D. Sand fly vectors of leishmania in the Americas: a mini review. **Entomology, Ornithology and Herpetology: Current Research**, Brussels, v. 4, n. 2, art. 1000144, p. 1-4, 2015. DOI: 10.4172/2161-0983.1000144.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; VINHAS, V.; WEYENBERGH, J.; BRODSKYN, C.; COSTA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 5, art. 113, p. 1-9, 2005. DOI: 10.1186/1471-2334-5-113.

CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **Scientific World Journal**, Boynton Beach, v. 11, p. 2391-2402, 2011. DOI: 10.1100/2011/213962.

CARNEIRO, M. B.; VAZ, L. G.; AFONSO, L. C. C.; HORTA, M. F.; VIEIRA, L. Q. Regulation of macrophage subsets and cytokine production in leishmaniasis. **Cytokine**, Oxford, v. 147, art. 155309, p. 1-9, 2021. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155309.

CASTRO, I. P.; SOUSA, M. V. C.; MAGALHÃES, G. M.; MUNDIM, A. V.; NOLETO, P. G.; PAULA, M. B. C.; PAJUABA NETO, A. A.; MEDEIROS, A. A. Perfil hepático e

protéico em cães com leishmaniose visceral. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 799-804, 2012.

CARRILLO, E.; MORENO, J.; CRUZ, I. What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 12, p. 579-580, 2013. DOI: 10.1016/j.pt.2013.10.007.

CHENOWETH, C. E.; SINGAL, S.; PEARSON, R. D.; BETTS, R. F.; MARKOVITZ, D. M. Acquired immunodeficiency syndrome-related visceral leishmaniasis presenting in a pleural effusion. **Chest**, Glenview, v. 103, n. 2, p. 648-649, 1993. DOI: 10.1378/chest.103.2.648.

COLOMBO, F. A.; ODORIZZI, R. M. F. N.; LAURENTI, M. D.; GALATI, E. A. B.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 2, p. 267-274, 2011. DOI: 10.1007/s00436-010-2247-6.

CONTRERAS, I. K.; MACHADO, M. A.; ROCHA, C. O. J. M.; OLIVERIA, G. R.; CARVALHO, F. C. G. Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras, Rio de Janeiro. **Pubvet Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 13, n. 4, art. a302, p. 1-6, 2019. DOI: 10.31533/pubvet.v13n4a302.1-6.

CORRÊA, A. P.; DOSSI, A. C.; VASCONCELOS, R. O.; MUNARI, D. P.; LIMA, V. M. Evaluation of transformation growth factor $\beta 1$, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Vet. Parasitol.** 143(3/4):267-274. 2006. DOI:10.1016/j.vetpar.2006.08.023. PMID:16979825.

COSTA, D. L. **Fatores de prognóstico na Leishmaniose visceral**: alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte. 2009. 214 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

COSTA, G. P.; SILVA, D. P. C.; ROCHA, D. O. A. C.; EIXEIRA, P. H. G. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Saber Científico**, Porto Velho, v. 9 n. 2, p. 95-104, 2020.

DASGUPTA, S.; SAHA, M.; CHAKRABARTI, S.; CHAKRABORTY, J. Visceral leishmaniasis with pleural effusion in an immunocompetent patient. **Lung India**, Mumbai, v. 31, n. 1, p. 56-58, 2014. DOI: 10.4103/0970-2113.125913.

DÍAZ-SÁEZ, V.; MERINO-ESPINOSA, G.; MORALES-YUSTE, M.; CORPAS-LÓPEZ, V.; PRATLONG, F.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 202, n. 3-4, p. 119-127, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.03.029.

DUARTE, M. I.; CORBETT, C. E. Histopathological and ultrastructural aspects of interstitial pneumonitis of experimental visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 78, n. 5, p. 683-688, 1984. DOI: 10.1016/0035-9203(84)90242-6.

DUARTE, M. I.; LAURENTI, M. D.; NUNES, V. L. B.; REGO JUNIOR, A. F.; OSHIRO, E. T.; CORBETT, C. E. P. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 431-436, 1986. DOI: 10.1590/S0036-46651986000600009.

DUARTE, M. I.; MATTA, V. L.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D.; CHEBABO, R.; GOTO, H. Interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 83, n. 1, p. 73-76, 1989. DOI: 10.1016/0035-9203(89)90712-8.

DYCE, K. M.; SACK, K. M.; WENSING, C. J. C. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 856 p.

EURELL, J. A.; FRAPPIER, B. L. **Histologia veterinária de Dellmann**. 6. ed. Barueri: Manole, 2012. 400 p.

EMILE, J. F.; ABLA, O.; FRAITAG, S.; HORNE, A.; HAROCHE, J.; DONADIEU, J.; REQUENA-CABALLERO, L.; JORDAN, M. B.; ABDEL-WAHAB, O.; ALLEN, C. E.; CHARLOTTE, F.; DIAMOND, E. L.; EGELER, R. M.; FISCHER, A.; HERRERA, J. G.; HENTER, J.; JANKU, F.; MERAD, M.; PICARSIC, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; ROLLINS, B. J.; TAZI, A.; VASSALLO, R.; WEISS, L. M. Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. **Blood**, New York, v. 127, n. 22, p. 2672-2681, 2016. DOI: 10.1182/blood-2016-01-690636.

FERRER, L.; RABANAL, R. M.; DOMINGO, M.; RAMOS, J. A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research in Veterinary Science**, London, v. 44, n. 2, p. 194-196, 1988.

FIOCRUZ. **Meu cão foi diagnosticado com leishmaniose visceral. Existe cura da doença nos animais?** Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2022.

FRIGERIO, E. D.; GUIZELINI, C. C.; JUSSIANI, G. G.; MARÇO, K. S.; MELO, G. D.; WATANABE, T. T. N.; MACHADO, G. F. Lymphocytic hypophysitis in dogs infected with *Leishmania* spp. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, 2023. DOI:10.3389/fvets.2023.1208919.

FREITAS, A.; KINOSHITA, A.; PIMENTEL, B.; MALHEIROS, D. A.; OLIVEIRA, E. R.; NASCIMENTO, G. Y. S.; JÚLIO, J. B.; PAES, J. M.; AMORIM, T. M. S.; ARAÚJO, T. L.; LONGO, B. F. P. Leishmaniose visceral canina: revisão. **Pubvet Medicina**

Veterinária e Zootecnia, Londrina, v. 16, n. 10, art. a1245, p. 1-20, 2022. DOI: 10.31533/pubvet.v16n10a1245.1-20.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. *In*: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 23-52.

GALATI, E. A. B.; FONSECA, M. B.; MARASSÁ, A. M. The subgenus *Migonemyia* Galati 1995 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), with description of a new espécie *Migonemyia vaniae*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 605-615, 2007. DOI: 10.1590/S0074-02762007005000064.

GARCÍA-CASTRO, A.; EGUI, A.; THOMAS, M. C.; LÓPEZ, M. C. Humoral and cellular immune response in asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis: a review. **Vaccines**, Basel, v. 10, n. 6, art. 947, p. 1-17, 2022. DOI: 10.3390/vaccines10060947.

GONÇALVES, R.; SILVA, S. O.; ALMEIDA, G. G.; SOUZA, C. C.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N. Detecção de DNA de *Leishmania infantum* no pulmão não parasitado de cães com leishmaniose visceral. **BMC Veterinary Research**, London, v. 14, art. 403, p. 1-6, 2018. DOI: 10.1186/s12917-018-1730-7.

GONÇALVES, R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; RASO, P.; TAFURI, W. L. Pneumonite intersticial crônica em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* : estudo histopatológico e morfométrico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 153-158, 2003. DOI: 10.1590/S0036-46652003000300007.

GOTO, H.; PRIANTI, M. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, n. 51, n. 5, p. 241-246, 2009. DOI: 10.1590/S0036-46652009000500002.

GRABARZ, F. **Células NKT, macrófagos M2 e o desenvolvimento da fibrose pulmonar**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinaria**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editorial Committee, 2017. 178 p.

KAVARNOS, I.; PARDALI, D.; BRELLOU, G. D.; PAPADOPOULOS, E.; KRITSEPI-KONSTANTINO, M.; ADAMAMA-MORAITOU, K. K. Bronchoscopy and lung fine-needle aspiration for antemortem evaluation of pulmonary involvement in dogs with naturally occurring canine leishmaniosis. **Pathogens**, Basel, v. 11, n. 3, art. 365, p. 1-12, 2022. DOI: 10.3390/pathogens11030365.

KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado de fisiologia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 608 p.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos**: texto e atlas colorido. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 804 p.

KOTSIFAS, K.; METAXAS, E.; KOUTSOUEVELIS, I.; SKOUTELIS, A.; KARA, P.; TATSIS, G. Visceral leishmaniasis with endobronchial involvement in an immunocompetent adult. **Case Reports in Medicine**, New York, v. 2011, art. 561985, p. 1-5, 2011. DOI: 10.1155/2011/561985.46.

LATSHAW, W. K. **Veterinary developmental anatomy**. Toronto: Decker, 1987. p. 119-125.

LAZZARINI, G.; ABRAMO, F.; ALBANESE, F.; PIRONE, A.; MIRAGLIOTTA, V. Combined immunohistochemical protocols to differentiate macrophages within the mononuclear-phagocyte system. **Annals of Anatomy**, Jena, v. 249, art. 152107, p. 1-6, 2023. DOI: 10.1016/j.aanat.2023.152107.

LIVNI, N.; ABRAMOWITZ, A.; LONDNER, M.; OKON, E.; MORAG, A. Immunoperoxidase method of identification of Leishmania in routinely prepared histological sections. **Virchows Archiv A. Pathological Anatomy and Histopathology**, Berlin, v. 401, n. 2, p. 147-151, 1983. DOI: 10.1007/BF00692639.

LÓPEZ, A. Respiratory system. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4. ed. St. Louis: Mosby, 2007. p. 463-558.

MAGALHÃES, N. A.; PINHO, F. A.; OLIVEIRA, F. L.; SILVA, K. R.; COSTA, F. A. L. Classificação das alterações pulmonares na leishmaniose visceral canina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 23, n. 1-2, p. 60-65, 2016. DOI: 10.4322/rbcv.2016.031.

MAIA, L. S. **Leishmaniose visceral canina**: aspectos clínicos e hematológicos de casos suspeitos e confirmados atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília em 2011. 2013. 30 f. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MARSHALL, B. G.; KROPF, P.; CLARK, C.; FLANAGAN, A. M.; DAVIDSON, R. N.; SHAW, R. J.; MÜLLER, I. Bronchopulmonary and mediastinal leishmaniasis: an unusual clinical presentation of Leishmania donovani infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 30, n. 5, p. 764-769, 2000. DOI: 10.1086/313763.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOZ-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by leishmania infantum in cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 3-4, p. 267-273, 2007. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.11.005.

MATHERON, S.; CABIÉ, A.; PARQUIN, F.; MAYAUD, C.; ROUX, P.; ANTOINE, M.; CHOUGNET, C.; COULAUD, J. P. Visceral leishmaniasis and HIV infection: unusual presentation with pleuropulmonary involvement, and effect of secondary prophylaxis. **AIDS**, London, v. 6, n. 2, p. 238-240, 1992.

MATHIAS, R. Internalization of immunoglobulins by endothelial cells in the liver, lung and kidney in hamster with visceral leishmaniasis. **Summaries of thesis: Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** 43 (4). 2001. DOI:10.1590/S0036-46652001000400017

MAXIE, M. G. **Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. 3 v.

MESCHER, A. L. **Junqueira's basic histology**: text and atlas. 14. ed. New York: McGraw Hill, 2016. 572 p.

MIYOSHI, M. H.; GUINSBURG, R. Desenvolvimento e crescimento pulmonar perinatal. *In*: KOPELMAN, B. I.; GUINSBURG, R. **Distúrbios respiratórios no período neonatal**. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 3-14.

MOORE, P. F. A review of histiocytic diseases of dogs and cats. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 51, n. 1, p. 167-184, 2014. DOI: 10.1177/0300985813510413.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V. Canine leishmaniasis: update on epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. **Veterinary Sciences**, Basel, v. 9, n. 8, art. 387, p. 1-20, 2022. DOI: 10.3390/vetsci9080387.

MOREIRA, P. R. R.; FERNANDO, F. S.; MONTASSIER, H. J.; ANDRE, M. R.; OLIVEIRA, R. V. Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 226, p. 69-73, 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.06.032.

MUXEL, S. M.; AOKI, J. I.; FERNANDES, J. C. R.; LARANJEIRA-SILVA, M. F.; ZAMPIERI, R. A.; ACUÑA, S. M.; MÜLLER, K. E.; VANDERLINDE, R. H.; FLOETER-WINTER, L. M. Arginine and polyamines fate in leishmania infection. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, art. 2682, p. 1-15, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02682.

NISHIDA, L. H. G.; DELMASCHIO, I. B. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP**, São José do Rio Preto, v. 1, n. 2, p. 7-15, 2017.

NOGUEIRA, F. S.; RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral. *In*: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. p. 1270-1298.

NYLEN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 4, p. 805-817, 2007. DOI: 10.1084/jem.20061141.

OLIVEIRA, D. K. R.; SOARES, M. E. H. S.; BRITO, K. M. L.; LIRA, E. S.; ROCHA, F. J. S. Aspectos imunológicos das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas. **Revista Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 23, n. 2, p. 1-14, 2021. DOI: 10.46551/ruc.v23n2a03.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS. **Leishmaniose**: relatório epidemiológico das Américas. Washington, DC, 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 4 jun. 2024.

OZBILGE, H.; AKSOY, N.; GUREL, M. S.; YAZAR, S. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 55, pt. 10, p.1329-1331, 2006. DOI: 10.1099/jmm.0.46667-0.

PARISI, F.; TESI, M.; MILLANTA, F.; GNOCCHI, M.; POLI, A. M1 and M2 tumour-associated macrophages subsets in canine malignant mammary tumours: an immunohistochemical study. **Research in Veterinary Science**, London, v. 136, p. 32-38, 2021. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.02.007.

PAULINO JR., D.; TONI, M. C.; MEIRELLES, A. E. W. B.; CANOLA, J. C.; CAMACHO, A. A. Achados radiográficos ou pneumonite urêmica em cães com insuficiência renal crônica. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 13-17, 2013.

PEREIRA, N. V. **Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar americana**. 2018. Tese (Doutorado em Dermatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. DOI: 10.11606/T.5.2018.tde-03072018-093855.

PERUHYPE-MAGALHAES, V.; MARTINS-FILHO, O. A.; PRATA, A.; SILVA, L. A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. FIGUEIREDO, R. M.; GUIMARÃES-CARVALHO, S. F.; FERRARI, T. C. A.; WEYENBERGH, J.; CORREA-OLIVEIRA, R. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha+ monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 146, n. 1, p. 124-132, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03171.x.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, London, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009. DOI: 10.1017/S0031182009991156.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Orgs.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. 360 p.

ROCHA, T. M. A.; SOARES, N. P.; BOMBONATO, N. G.; PEREIRA, V. Alterações renais em cães diagnosticados com leishmaniose visceral canina em Patos de Minas (MG). **Revista Animal em Foco**, v. 2:70-79, 2022.

ROCHA, S. T. F.; SHIOSI, R. K.; FREITAS, A. B. M. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 20, n. 34, p. 1-13, 2020.

ROSÁRIO, C.; DOMINICI, M.; OLIVEIRA, M.; LIMA, C.; PEREIRA, J.; MELO, F. Quantificação da IL-10 e do INF- γ em cães com ou sem sinais clínicos de infecção com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 38. 129-132. 2018. DOI:10.1590/1678-5150-pvb-5107.

ROSENTHAL, E.; MARTY, P.; PESCE, A. *Leishmania* in bronchoalveolar lavage. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 114, n. 12, p. 1064-1065, 1991. DOI: 10.7326/0003-4819-114-12-1064_2.

SALIM, P. H.; XAVIER, R. M. Influência dos polimorfismos genéticos (IL10/CXCL8/CXCR2/ NF κ B) na susceptibilidade das doenças reumatológicas autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**. V. 54, Issue 4, 2014. Pages 301-310, ISSN 0482-5004. DOI:10.1016/j.rbr.2013.10.006.

SARKER, C. B.; CHOWDHURY, K. S.; SIDDIQUI, N. I.; JAMAL, M. F.; RAHMAN, S.; MOMEN, A.; DHAR, D. K.; ALAM, K. S. Clinical profile of Kala-azar in adults: as seen in Mymensingh Medical College Hospital, Mymensingh, Bangladesh. **Mymensingh Medical Journal**, Bangladesh, v. 12, n. 1, p. 41-44, 2003.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.72.

SHIMABUKURO, P. H. F.; MARASSÁ, A. M.; GALATI, E. A. B. *Brumptomyia carvalhoi* sp. nov. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Atlantic forest domain, São Paulo State, Brazil. **Zootaxa Mega-Journal for Zoological Taxonomists in the World**, Auckland, v. 1637, n. 1, p. 47-54, 2007. DOI: 10.11646/zootaxa.1637.1.4.

SILVA, A. O.; SILVA, S. B.; PIRES, C. B. R.; GONÇALVES, L. S. L.; COERTJENS, P. C.; COERTJENS, M. Adaptações crônicas sobre a função pulmonar em indivíduos infectados pela leishmaniose visceral. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 403-411; 2013. DOI:10.1590/S0103-51502013000200018.

SILVA, L. C.; CASTRO, R. S.; FIGUEIREDO, M. M.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 133-143, 2013. DOI: 10.1111/iep.12010.

SILVA, R. R.; SILVA, A. S.; SANTOS, P. L.; CAMPOS, R. N. S. Leishmaniose visceral em cães no Brasil: revisão de literatura. **Science and Animal Health**, Pelotas, v. 9, n. 1, p. 54-75, 2021. DOI: 10.15210/sah.v9i1.

SPIGHT, D.; ZHAO, B.; HAAS, M.; WERT, S.; DENENBERG, A.; SHANLEY, T. P. Immunoregulatory effects of regulated, lung-targeted expression of IL-10 in vivo. **Am**

J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005;288:L251–L265.
DOI:10.1152/ajplung.00122.2004

STEEN, E. H.; WANG, X.; BALAJ, S.; BUTTE, M. J.; BOLLYKY, P. L.; KESWANI, S. G. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. **Adv Wound Care** (New Rochelle). 2020 Apr 1;9(4):184-198. DOI: 10.1089/wound.2019.1032.

TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001. DOI: 10.1016/s0304-4017(00)00436-2.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004. DOI: 10.1016/j.jim.2004.05.009.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; BORTOLETI, B. T. S.; ASSOLINI, J. P.; GONÇALVES, M. D.; CARLOTO, A. C. M.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; CONCHON-COSTA, I.; BRODIGNON, J.; PAVANELLI, W. R. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, art. 2529, p. 1-12, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02529.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 4, 1051-1057, 2011. DOI: 10.1007/s00436-011-2345-0.

TRUJILLO, G.; O'CONNOR, E. C.; KUNKEL, S. L.; HOGABOAM, C. M. A novel mechanism for CCR4 in the regulation of macrophage activation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 172, n. 5, p. 1209-1221, 2008. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070832.

TUON, F. F.; GUEDES, F.; FERNANDES, E. R.; PAGLIARI, C.; AMATO, V. S.; DUARTE, M. I. S. In situ immune responses to interstitial pneumonitis in human visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 98-103, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2008.01080.x.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J Exp Med.** 1968;128(3):415-35.

VIOL, M. A.; GUERRERO, F. D.; OLIVEIRA, B. C. M.; AQUINO, M. C. C.; LOIOLA, S. H.; MELO, G. D.; GOMES, A. H. S.; KANAMURA, C. T.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; LIMA, V. M. F.; BRESCIANI, K. D. S. Identification of Leishmania spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of Rhipicephalus sanguineus actively infesting dogs. **Parasitology Research**, Berlin, v. 115, n. 9, p. 3479-3484, 2016. DOI: 10.1007/s00436-016-5111-5.

WANG, Q.; NI, H.; LAN, L.; WEI, X.; XIANG, R.; WANG, Y. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. **Cell Research**, Beijing, v. 20, n. 6, p 701-712, 2010. DOI: 10.1038/cr.2010.52.

WEIGAND, M. A.; HORNER, C.; BARDENHEUER, H. J.; BOUCHON, A. The systemic inflammatory response syndrome. **Best Practice and Research. Clinical Anaesthesiology**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 455-475, 2004. DOI: 10.1016/j.bpa.2003.12.005.

ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. 1408 p.

ZANLUQUI, N. G.; WOWK, P. F.; PINGE-FILHO, P. Macrophage polarization in Chagas Disease. **Journal of Clinical and Cellular Immunology**, Brussels, v. 6, n. 2, art. 317, p. 1-6, 2015. DOI: 10.4172/2155-9899.1000317.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Caracterização histopatológica e imunoistoquímica das lesões pulmonares inflamatórias em cães naturalmente infectados por leishmania infantum"**, Processo FOA nº 523-2023, sob responsabilidade de Gisele Fabrino Machado apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 27 de Junho de 2023.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 24 de Novembro de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 24 de Dezembro de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Histopathological and immunohistochemical characterization of inflammatory pulmonary lesions in dogs naturally infected with Leishmania infantum"**, Protocol FOA nº 523-2023, under the supervision of Gisele Fabrino Machado presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 27, 2023.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 24, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 24, 2024.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

APÊNDICE A - TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela S1 - Tabela com dados brutos do experimento dos animais do grupo infectado (G1).

Cães	CD3+	RCA-1	CD204+	Fibrose	<i>Leishmania</i> (ELISA+RIFI)	EC	EI	IHQ- <i>Leishmania</i>
1	280	39	28	0	Positivo	1	1	Negativo
2	865	165	113	0	Positivo	3	2	Negativo
3	879	122	84	0	Positivo	2	2	Negativo
4	1015	102	65	0	Positivo	3	3	Negativo
5	850	107	71	0	Positivo	2	2	Negativo
6	861	83	63	0	Positivo	2	2	Negativo
7	587	46	25	0	Positivo	2	1	Negativo
8	331	65	57	0	Positivo	1	1	Negativo
9	987	85	51	0	Positivo	2	3	Positivo
10	1028	154	81	0	Positivo	3	3	Negativo
11	542	58	42	0	Positivo	2	2	Negativo
12	662	78	65	0	Positivo	2	2	Negativo
13	838	71	61	1	Positivo	2	2	Positivo
14	213	62	30	0	Positivo	4	1	Negativo
15	413	68	37	0	Positivo	2	1	Negativo
16	983	61	50	0	Positivo	2	3	Negativo
17	581	72	39	0	Positivo	2	2	Negativo

*EC: estágio clínico.

*EI: escore de inflamação.

*0: ausente; 1: discreto (EI) / presente e discreto (fibrose); 2: moderado (EI); 3: acentuado (EI).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela S2 - Tabela com dados brutos do experimento dos animais do grupo controle (G2).

Cães	CD3+	RCA-1	CD204+	Fibrose	<i>Leishmania</i> (ELISA+RIFI)	EC	EI	IHQ- <i>Leishmania</i>
1	87	48	7	0	Negativo	NA	NA	Negativo
2	76	52	9	0	Negativo	NA	NA	Negativo
3	91	43	6	0	Negativo	NA	NA	Negativo
4	68	39	9	0	Negativo	NA	NA	Negativo
5	64	41	13	0	Negativo	NA	NA	Negativo

*EC: estágio clínico.

*EI: escore de inflamação.

*0: ausente.

*NA: não se aplica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela S3 - Tabela com dados de achados hematológicos e bioquímica sérica dos animais do grupo infectado (G1).

ANIMAIS	ACHADOS DE HEMOGRAMA					BIOQUÍMICA SÉRICA			
-	-	-	-	-	-	PT	Albumina	Creatinina	Uréia
-	Anemia	Leucocitose	Linfopenia	Trombocitopenia	Hiperproteinemia	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
1	S	S	S	N	S	10,3	1,09	1,25	87
2	S	N	S	N	N	5,2	0,89	1,15	34
3	N	S	S	N	N	8,0	3,03	1,82	15
4	S	N	S	N	S	11,7	1,37	2,12	95
5	S	N	N	N	S	8,8	1,54	0,88	28
6	S	N	N	N	S	8,1	1,22	2,31	73
7	S	S	N	N	N	6,5	0,85	1,33	169
8	N	N	N	N	S	7,7	2,71	1,35	23
9	S	S	N	N	S	6,9	1,68	1,02	53
10	N	N	N	N	N	5,4	1,82	0,94	21
11	S	S	S	N	N	6,0	0,89	2,4	85
12	S	N	S	N	S	8,4	2,0	2,49	108
13	S	S	S	N	S	-	-	-	-
14	S	N	S	S	S	12,0	1,45	2,08	165
15	S	N	S	S	S	11,2	1,57	1,25	23
16	S	N	N	N	S	11,5	1,12	1,38	50
17	N	N	N	N	S	9,4	2,17	1,07	24
18	S	S	N	N	N	7,9	0,69	0,75	21
19	N	N	N	N	N	9,3	2,19	1,46	33
20	S	N	S	N	S	8,3	1,75	0,88	46
21	S	N	S	S	N	7,8	0,86	1,09	51
22	S	N	N	S	S	9,5	2,15	0,6	31
23	N	N	N	N	N	6,8	3,9	1,0	43
24	S	N	N	N	S	5,4	2,33	1,39	73
25	S	N	N	N	S	13,2	2,36	1,13	100
26	N	N	N	N	S	8,2	2,9	0,86	36
27	S	S	S	N	N	7,7	1,16	0,87	40
28	N	S	N	N	N	5,8	2,66	0,93	24
29	N	N	S	N	N	7,5	3,68	1,15	10
30	S	N	N	S	N	-	1,87	-	31
31	S	S	N	N	S	9,0	1,5	1,42	69
32	N	N	S	N	S	8,0	2,77	1,13	30
33	N	N	N	S	N	6,7	4,12	1,03	26
34	S	N	S	S	S	11,2	1,6	0,88	29
35	S	N	S	N	N	6,4	1,5	0,68	46
36	N	S	N	N	S	9,9	3,19	1,17	32
37	N	N	N	S	S	10,2	2,13	1,21	46

38	S	N	S	S	N	6,1	1,12	1,42	92
39	S	N	N	N	S	14,3	1,96	1	31
40	N	S	N	N	N	7,3	3,13	1,31	26
41	S	N	N	N	S	9,9	0,95	0,78	53
42	S	N	S	N	S	11,66	1,84	1,14	127
43	S	S	N	N	N	6,81	0,65	0,66	20
44	S	N	S	N	S	7,91	0,79	0,79	22
45	N	N	N	N	S	8,88	3,04	1,29	56
46	N	N	S	N	N	7,56	2,58	1,13	27
47	S	N	N	S	S	9,4	2,52	0,77	40
48	S	N	N	N	S	8,16	2,84	1,12	65
49	S	N	S	N	S	8,1	2,65	1	41
50	S	N	S	N	S	11,27	2,88	2,3	200
51	S	N	N	S	S	9	2,07	0,5	21
52	S	N	N	N	S	11,7	2,34	0,5	21
53	S	N	N	S	S	8,8	2,3	0,5	26
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	S	N	N	S	S	11	-	0,5	207
56	S	S	N	N	S	11,4	2,77	0,5	78
57	N	N	N	S	S	9,5	3	15,5	491
58	S	N	N	N	N	7,6	2,08	0,5	23
59	N	N	N	N	N	6,2	2,55	0,85	38
60	N	N	N	N	N	7,1	2,1	1,12	27
61	N	N	N	N	N	6,47	4,5	1,38	32
62	N	N	N	N	N	7	2,78	0,5	40

*S: sim;

*N: não.

Fonte: Elaborado pelo autor.