UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RELAÇÃO ENTRE AS LESÕES HISTOLÓGICAS E A CARGA PARASITÁRIA DA REGIÃO UNGUEAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*

Paulo Henrique Leal Bertolo
Médico Veterinário

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RELAÇÃO ENTRE AS LESÕES HISTOLÓGICAS E A CARGA PARASITÁRIA DA REGIÃO UNGUEAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*

Paulo Henrique Leal Bertolo
Orientadora: Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos
Coorientadoras: Profa. Dra. Pamela Rodrigues Reina Moreira
Profa. Dra. Daniela Bernadete Rozza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal

2017

Bertolo, Paulo Henrique Leal
B546r Relação entre as lesões histológicas e a carga parasitária da região ungueal de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* / Paulo Henrique Leal Bertolo. – – Jaboticabal, 2017
xii, 39 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos
Banca examinadora: Claudia Momo, Daniela Gomes da Silva
Bibliografia

1. Cão. 2. Leishmaniose visceral. 3. Dígito. 4. Onicogrifose. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993.161:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RELAÇÃO ENTRE AS LESÕES HISTOLÓGICAS E A CARGA PARASITÁRIA DA REGIÃO UNGUEAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*

AUTOR: PAULO HENRIQUE LEAL BERTOLO
ORIENTADORA: ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
COORIENTADORA: PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA
COORIENTADORA: DANIELA BERNADETE ROZZA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. CLAUDIA MOMO
Departamento de Patologia / FMVZ - USP - São Paulo,SP

Pós-doutoranda DANIELA GOMES DA SILVA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULO HENRIQUE LEAL BERTOLO – Nascido em 29 de setembro de 1988, na cidade de Belém, Pará, Brasil. Médico veterinário formado em fevereiro de 2013, na Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém – PA. Durante o curso de graduação foi bolsista da referida universidade, na condição de monitor das disciplinas Patologia Geral e Patologia Veterinária, no período de março de 2011 a fevereiro de 2013, sob a orientação do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira e da Profa. Dra. Adriana Maciel de Castro Cardoso. Ingressou no Programa de Residência Multiprofissional da Saúde e Área Profissional da Saúde, na condição de médico veterinário residente em Patologia Veterinária, no período de março de 2013 a fevereiro de 2015, sob a orientação da Profa. Dra. Adriana Maciel de Castro Cardoso e do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira. Ingressou em março de 2015, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal/SP, na área de concentração em Patologia Animal, sob a orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Durante o mestrado foi bolsista da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

O alto preço de viver longe de casa – muito além do valor do aluguel

“Aprendemos a fazer um milhão de coisas, mas voar… Voar a vida não deixou. Aí o homem foi lá e criou o Boeing 737. E a gente descobriu que, mesmo sem asas, poderia voar. Mas a grande complicação foi quando a gente percebeu que poderia ir sem data para voltar. E assim começaram a surgir os corajosos que deixaram o aconchego do lar para estudar e sonhar com o futuro incrível e hipotético que os espera. Os corajosos que deixaram cidades amadas para viver oportunidades que não aparecem duas vezes. Os corajosos que deixaram, enfim, a vida que tinham nas mãos, para voar para vidas que decidiram encarar de peito aberto. A vida de quem inventa voar é paradoxal, todo dia. É o peito eternamente divido. É chorar porque queria estar lá, sem deixar de querer estar aqui. É ver o céu e o inferno na partida, o pesadelo e o sonho na permanência. É se orgulhar da escolha que te ofereceu mil tesouros e se odiar pela mesma escolha que te subtraiu outras mil pedras preciosas. E começamos a viver um roteiro clássico: deitar na cama, pensar no antigo-eterno lar, nos quilômetros de distância, nas pessoas amadas, no que eles estão fazendo sem você, nos risos que você não riu, nos perrengues que você não estava lá para ajudar. É tentar, sem sucesso, conter um chorinho de canto e suspirar sabendo que é o único responsável pela própria escolha. No dia seguinte, ao acordar, já está tudo bem, a vida escolhida volta a fazer sentido. Mas você sabe que outras noites dessa virão. Eu sei que não é fácil. E que admiro quem encarou e encara tudo isso, todo dia. Para quem tenta, para quem peita, para quem vai, o preço é alto. A gente se questiona, a gente se culpa, a gente se angustia. Mas o destino, a vida e o peito às vezes pedem que a gente embarque. Alguns não vão. Mas nós, que fomos, viemos e iremos, não estamos livres do medo e de tantas fraquezas. Mas estamos para sempre livres do medo de nunca termos tentado. Keep walking.”

(Ruth Manus, 2015)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me proteger, abençoar e iluminar os caminhos que escolhi.

Aos meus pais, Paulo Afonso Bertolo e Náira Lucilea Leal Barbosa que sempre nos deram conselhos, educação e muito amor! E que batalharam a vida inteira para que nos tornássemos pessoas do bem por meio do incentivo ao estudo.

Aos meus irmãos, Paulo Afonso Bertolo Júnior e Paula Patrícia Leal Bertolo pela amizade, cumplicidade, apoio às minhas escolhas e me deram a honra de ser padrinho de suas filhas.

Aos meus sobrinhos, Juliane de Sousa Bertolo, Davi Augusto Bertolo de Oliveira, Pietra Flor Bertolo de Oliveira e João Lucas Rodrigues Bertolo que sempre transmitem alegria, o amor puro das crianças, e que sempre fazem a festa quando volto pra casa. O titio ama muito cada um.

Ao meu amor, Maria Eduarda Moutinho, pela amizade, cumplicidade, confiança, amor e carinho, e por acreditar nos nossos sonhos. Obrigado por tudo! Quero sempre estar ao teu lado te fazendo feliz. Amo-te muito!

Aos nossos “filhos” Black, Mérope e Nino que são companheiros de viagem, pelos momentos inesquecíveis nos passeios no final da tarde pelas ruas ou na UNESP, pelas brincadeiras, pelos lambeijos de carinho e demonstração de amor! Saudades do nosso “Ursão”.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, que aceitou a me orientar mesmo não me conhecendo e acreditou no meu potencial, espero continuar tendo sua confiança e não desapontá-la.

Às minhas coorientadoras, Profa. Dra. Pamela Rodrigues Reina Moreira e Profa. Dra. Daniela Bernadete Rozza, que me auxiliaram da maneira que puderam, com o projeto e coleta das amostras.

À CAPES, pela concessão da bolsa que permitiu a execução do nosso estudo.

Ao Rafael Silva Cipriano, médico veterinário do Centro de Controle de Zoonoses do munícipio de Araçatuba, que nos permitiu coletar as amostras no CCZ e também aos funcionários do CCZ pela paciência e ajuda nas coletas.

Aos funcionários e ex-funcionários do Departamento de Patologia Veterinária desta instituição pela colaboração, em especial à Francisca de Assis Ardison, por ter tido a paciência de me ajudar inicialmente com o processamento das amostras.

À Bianca Rochani, por ter me alojado em Araçatuba e ter me recebido tão bem em sua casa.

Às minhas amigas de laboratório, Pamela Moreira, Mayara Rosolem e Tatianna Frate pelas conversas sérias com o intuito de ajudar de alguma maneira no projeto, e principalmente pelas conversas descontraídas na salinha com a finalidade de relaxar e desestressar.

Aos meus amigos, Maria Eduarda Moutinho, Rodrigo Albuquerque, Ana Cláudia Albuquerque e Marcela Moraes pelo tempo em que convivemos juntos, pelas nossas conversas e momentos de gargalhadas com as nossas “galassequices”, com certeza amenizaram a ausência de casa e fortalecemos ainda mais nossa amizade.

Aos meus amigos paraenses Maria Eduarda Moutinho, Rodrigo Albuquerque, Ana Cláudia Albuquerque, Victor Santos, Elaine Santos, Vivian Tavares, Damazio Campos, Priscila Del Aguila pelos momentos de diversão e pelos almoços, lanches e jantares paraenses, matando a saudade da nossa terra.

Aos amigos de Jaboticabal pela convivência, respeito e amizade, que tornaram mais leve e divertido os anos aqui.

SUMÁRIO

Página

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA..... viii

Resumo..... ix

Abstract..... x

Lista de figuras..... xi

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais..... 1

1. Introdução..... 1

2. Revisão de literatura..... 2

2.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral Canina..... 2

2.2 Resposta imunológica do cão..... 4

2.3 Alterações clinico-patológicas e sintomatologia clínica..... 6

3. Referências..... 8

CAPÍTULO 2 – Relação entre as lesões histológicas e a carga parasitária da região ungueal de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

1. Introdução..... 13

2. Material e métodos..... 13

3. Resultados..... 16

4. Discussão..... 22

5. Conclusão..... 24

6. Referências..... 26

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 11976/15 do trabalho de pesquisa intitulado **"Relação entre a onicogrifose e as alterações morfológicas da região ungueal de cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum chagasi*"**, sob a responsabilidade da Profª Drª Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

RELAÇÃO ENTRE AS LESÕES HISTOLÓGICAS E A CARGA PARASITÁRIA DA REGIÃO UNGUEAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*

RESUMO – A onicogrifose é um dos principais achados clínicos em cães com Leishmaniose Visceral (LV), porém são escassas as pesquisas com enfoque na região ungueal de cães infectados. O objetivo do presente estudo foi avaliar a região ungueal de cães com LV que apresentaram ou não onicogrifose, por meio das análises histopatológica e imuno-histoquímica. O terceiro dígito dos membros torácico e pélvico foi colhido de 16 cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, sem predileção por sexo, raça ou idade. Os animais foram divididos em dois grupos, cães com onicogrifose (GO; n=7) e sem onicogrifose (GSO; n=9). Os dígitos foram avaliados em quatro regiões (epiderme/derme dorsal, epiderme/derme ventral, matriz ungueal dorsal e matriz ungueal ventral). Todas as lesões observadas (infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração vacuolar dos queratinócitos basais, separação dermo-epidérmica e incontinência pigmentar) estavam presentes em ambos os grupos, porém em maior intensidade nos dígitos de cães com onicrogrifose. A imunomarcação das formas amastigotas de *Leishmania infantum* foi observada nas diferentes áreas do dígito. Observou-se diferença estatística entre as áreas de epiderme/derme dorsal com a matriz dorsal e com a matriz ventral nos dígitos do membro pélvico e, entre a epiderme/derme dorsal com a matriz dorsal no membro torácico do grupo GO. Conclui-se que a principal alteração histopatológica da região ungueal de cães com LV é o infiltrado inflamatório mononuclear independente da presença de onicogrifose. Estes animais apresentaram a presença do parasita na região responsável pelo crescimento da unha. Esta onicopatia parece estar associada à presença do parasita e ao microambiente inflamatório local.

Palavras-chave: cão, leishmaniose visceral, dígito, onicogrifose.

RELATIONSHIP BETWEEN HISTOLOGICAL INJURIES AND PARASITIC LOAD OF NATURALLY INFECTED DOGS' CLAW WITH *Leishmania infantum*

ABSTRACT – Onychogryphosis is among the main clinical findings in dogs with Visceral Leishmaniasis (VL). However, there are few researches focusing on the claw region of infected dogs. This aim of this study was to evaluate claw region of dogs with symptomatic CanL with and without onychogryphosis, through histopathological and immunohistochemical analyzes. The third digit of the right thoracic and pelvic limbs was collected from 16 dogs with CanL, without for sex, breed or age predilection. The dogs were divided into two groups, dogs with (GO; n = 7) and without onychogryphosis (GSO; n = 9). The digits were evaluated in four regions (dorsal epidermis / dermis, dorsal matrix / dermis, ventral matrix / dermis, ventral epidermis / dermis). All the lesions observed (mononuclear inflammatory infiltrate, basal keratinocyte vacuolation, dermoepidermal clefting and pigmentary incontinence) were presente in both groups, but more strongly in the digits of dogs with onychogryphosis. Immunohistochemistry revealed numerous amastigotes in the different areas of the digit. Statistical difference was observed between dorsal epidermis / dermis areas with dorsal matrix / dermis and ventral matrix / dermis in the digits of the pelvic limb, and between dorsal epidermis / dermis áreas with dorsal matrix / dermis of the thoracic limb in dogs with onychogryphosis. In conclusion, main histopathological alteration of the claw region of dogs with CanL was mononuclear inflammatory infiltrate in the dorsal epidermis / dermis area independently of onychogryphosis. The dogs presented high parasitic load in the region responsible for the growth of the nail. This onycopathy does not appear to be associated only with presence of the parasite, but also with local inflammatory microenvironment, which possibly contributes to onychogryphosis by release of inflammatory mediators at the site.

Keywords: dog, visceral leishmaniasis, digit, onychogryphosis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – Relação entre as lesões histológicas e a carga parasitária da região ungueal de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

Figura 1. Secção sagital mediana do terceiro dígito torácico de cão com leishmaniose visceral. Notar as diferentes áreas do dígito canino. (1) Tendão do músculo flexor profundo dos dedos, (2) Parte da falange média do terceiro dígito, (3) Tendão do músculo extensor profundo dos dedos, (4) Epiderme/derme dorsal, (5) Matriz ungueal dorsal, (6) Parede da unha, (7) Parte da falange distal do terceiro dígito, (8) Matriz ungueal ventral, (9) Epiderme/derme ventral (coxim digital).....15

Figura 2. Fotomicrografias das alterações histopatológicas nas diferentes áreas do dígito de cão com leishmaniose visceral. (A) Infiltrado inflamatório (*) distribuído de forma difusa na epiderme/derme dorsal (barra=100µm). (B) Na mesma área observa-se Infiltrado inflamatório contendo macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania* spp. (setas e detalhe, barra=20µm). (C) Infiltrado inflamatório (*) e incontinência pigmentar (seta), presentes na matriz ungueal dorsal (barra=100µm). (D) Infiltrado inflamatório (*) e separação dermo-epidérmica acentuada (seta) na matriz ungueal ventral (barra=100µm). Hematoxilina e Eosina.....18

Figura 3. Fotomicrografias das imunomarcações das formas amastigotas de *Leishmania infantum* no dígito de cães com leishmaniose visceral. (A) Notar a detecção do parasito no citoplasma de macrófagos na epiderme/derme dorsal (*; detalhe; barra=50µm). (B) Macrófagos parasitados presentes na matriz ungueal dorsal (*; detalhe; barra=100µm). (C) Presença do parasito na matriz ungueal ventral (*; detalhe; barra=100µm). (D) Focos com macrófagos parasitados na epiderme/derme ventral (coxim digital) (*; detalhe; barra=representa 100µm). Complexo de polímeros ligados à peroxidase.....19

Figura 4. Medianas da carga parasitária observadas na comparação entre os grupos. (A) membro torácico (p=0,739) e (B) membro pélvico (p=0,450). Grupo com onicogrifose (GO) e sem onicogrifose (GSO). Teste não paramétrico de Mann-Whitney.....20

Figura 5. Medianas da carga parasitária observadas na comparação entre as áreas distintas do dígito de animais sem onicogrifose (GSO). (A) membro torácico (p=0,476) e (B) membro pélvico (p=0,256). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.....20

Figura 6. Medianas da carga parasitária observadas na comparação entre as áreas distintas do dígito entre os grupos. (A) membro torácico (p>0,999) e (B) membro pélvico (p>0,999). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.....21

Figura 7. Medianas da carga parasitária observadas na comparação entre as áreas distintas do dígito de animais com onicogrifose (GO). (A) membro torácico (p=0,004) e (B) membro pélvico (p=0,020). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.....22

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma enfermidade crônica, considerada uma antropozoonose de grande importância mundial, devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade humana em regiões endêmicas (CARVALHO NETA et al., 2007), tornando-a uma das doenças mais importantes da atualidade (BRASIL, 2014).

Esta doença pode acometer o ser humano, o cão e os animais silvestres (BRASIL, 2014). O agente etiológico é o protozoário *Leishmania infantum* (BANETH et al., 2008). A transmissão da LV no hospedeiro vertebrado se dá pela ação hematófaga de insetos vetores da espécie *Lutzomyia longipalpis* (BARATA et al., 2004). O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* pode albergar o parasita, mas ainda não está comprovada a sua capacidade de transmitir a forma infectante de *Leishmania* spp. (promastigota metacíclica) para o hospedeiro canino (DANTAS-TORRES; LATROFA; OTRANTO, 2011). Todavia, a transmissão vertical transplacentária em cadelas (ROSYPAL et al., 2005), bem como transmissão venérea (SILVA et al., 2009), têm sido relatadas.

Os cães são considerados os principais reservatórios da doença em áreas urbanas (SILVA, 2007). O cão com LV representa um grande problema de saúde pública, visto que a infecção canina é mais prevalente que a infecção no homem, além de apresentar grande contingente de animais assintomáticos que albergam parasitos na derme (QUEIROZ et al., 2010; JACINTHO, 2012; MOREIRA et al., 2013), o que alerta para a importância desses animais no ciclo de transmissão da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

As formas amastigotas de *Leishmania* spp. podem ter ampla distribuição nos tecidos de cães (REIS et al., 2009). Os principais sinais clínicos observados nos cães acometidos pela LV são linfadenomegalia, dermatopatias, hepatoesplenomegalia, oftalmopatias, onicogrifose, entre outros (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A onicogrifose é o crescimento demasiado das unhas e está entre os principais achados clínicos em cães infectados por leishmaniose visceral. Esta onicopatia pode decorrer da presença do parasito na matriz ungueal e/ou do não desgaste normal das

unhas (ALEXANDRE-PIRES; CORREIA, 2008). No entanto, a literatura é escassa quanto ao estudo da região ungueal de cães positivos para LVC.

Portanto, o presente estudo objetivou avaliar as alterações hematológicas e do proteinograma sérico de cães com LV, além de analisar a região ungueal do terceiro dígito dos membros torácico e pélvico de cães com LV que possuíam ou não onicogrifose, por meio da análise histopatológica e imuno-histoquímica, e também, determinar as lesões nas diferentes áreas ungueais como epiderme/derme dorsal, matriz ungueal dorsal, matriz ungueal ventral, epiderme/derme ventral (coxim digital), correlacionando estes achados com a presença de onicogrifose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral canina

A LV é uma enfermidade crônica, considerada uma antropozoonose que possui ampla distribuição, ocorrendo na Europa, Ásia, África e nas Américas. Cerca de 90% dos casos, da América Latina, advêm do Brasil, com maior representatividade para a Região Nordeste (BRASIL, 2014). Por muito tempo a leishmaniose foi considerada um problema restrito às áreas rurais do Brasil, no entanto esse panorama tem mudado devido à crescente prevalência de casos próximos à periferia de grandes centros urbanos, como Araçatuba e Bauru, no Estado de São Paulo (SERRANO et al., 2008).

Nos centros urbanos os principais reservatórios da LV são os cães (SILVA, 2007), tornando-os importantes no ciclo de transmissão da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2011), visto que os cães apresentam infecção mais prevalente que a infecção humana, e animais assintomáticos albergam parasitos na derme (QUEIROZ et al., 2010; JACINTHO, 2012; MOREIRA et al., 2013).

Os protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* como *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonenses*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* , *Leishmania* (*Viannia*) *lindenberg* e *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* causam a leishmaniose tegumentar (BRASIL, 2007). Já as espécies *Leishmania (Leishmania) donovani, Leishmania*

(Leishmania) infantum e Leishmania (Leishmania) chagasi são causadores da leishmaniose visceral. (BRASIL, 2014).

O parasita apresenta-se sob duas formas morfológicas distintas, a promastigota que é a forma com flagelo livre encontrada no tubo digestivo dos vetores invertebrados e a amastigota que é a forma sem flagelo livre, encontrada no citoplasma de células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente nos macrófagos (SANTOS-GOMES et al., 2008).

A transmissão da doença ocorre com a participação dos insetos vetores, denominados flebotomíneos, também conhecidos vulgarmente como mosquito-palha, tatuquiras, birigui, entre outros. No Brasil, as espécies de mosquito *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* estão envolvidas na transmissão da LV (SANTOS-GOMES et al., 2008; BRASIL, 2014).

A espécie *L. longipalpis* possui vasta distribuição geográfica, ocorrendo nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Originalmente esta espécie de mosquito era encontrada próxima à matas, tendo início o ciclo primário de transmissão envolvendo os animais silvestres como reservatórios, principalmente as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) (BRASIL, 2014) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (SANTIAGO et al., 2007). No final dos anos 80, na região Sudeste, foi identificada a adaptação do vetor aos ambientes urbanos, podendo ser encontrado no peridomicílio e intradomicílio, favorecendo a transmissão para o cão, tornando este o principal reservatório em áreas urbanas (SILVA, 2007).

As leishmanias possuem ciclo biológico heteróxeno, necessitando de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. A infecção do vetor acontece quando a fêmea do mosquito flebotomínio realiza seu repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingere macrófagos contendo as formas amastigotas de *Leishmania* spp., que posteriormente sofrem diferenciação no aparelho digestório do inseto vetor em promastigotas. Estas se transformam até promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes aos hospedeiros vertebrados (TOMÁS; ROMÃO, 2008).

A fêmea infectada do inseto, ao realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, inocula juntamente com a saliva as formas promastigotas metacíclicas. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) e no interior dos macrófagos, diferenciam-

se em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento dos mesmos, ocorrendo a liberação destas formas, que em seguida irão infectar novos macrófagos. Deste modo, o protozoário não fica limitado à pele, o que permite a sua disseminação sistêmica no hospedeiro, principalmente, para os órgãos ricos em SFM, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

2.2 Resposta imunológica do cão

O agravamento da LV no cão está associado a diversos fatores, envolvendo características do parasita, da relação parasita-hospedeiro e a resposta imune ao parasita (SANTOS-GOMES et al., 2008). O estudo desta resposta é imprescindível para a compreensão do processo infeccioso e caracterização da doença (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

As células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas e as de Langerhans, atuam como células sentinelas na epiderme e parecem possuir funções protetoras numa infecção causada por *Leishmania* spp. (MORENO, 2007). As APCs são especializadas no reconhecimento, apreensão de antígenos e transporte, com o objetivo de apresentá-los aos linfócitos T virgens, que irão se diferenciar em linfócitos T auxiliares (CD4) ou em linfócitos T citotóxicos (CD8) (WILSON; VILLADANGOS, 2004).

Pelo fato do parasita ser intracelular obrigatório, a defesa imunológica depende da atividade dos linfócitos T (FREITAS; PINHEIRO, 2010). Os linfócitos T CD4 podem se diferenciar em subpopulações de linfócitos efetores, sendo denominados linfócitos T auxiliares 1 (Th1), linfócitos T auxiliares 2 (Th2), linfócitos T auxiliares 17 (Th17) e os linfócitos T regulatórios (Treg) (HAILU et al., 2005).

A diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* spp. depende da proporção das subpopulações de linfócitos T CD4 (linfócitos Th1 e Th2). A resistência à infecção está associada à ativação das células Th1, que promovem resposta imune celular protetora, por meio da produção de citocinas, como interleucina 2 (IL-2), Interferon gama (INF-γ) e o Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), que por sua vez ativam os macrófagos e os estimulam a sintetizar substâncias tóxicas para promover a lise do parasita (SANTOS-GOMES et al., 2008).

A susceptibilidade está relacionada à ativação de células Th2, que produzem resposta imune humoral, caracterizada por citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que suprimem a ação dos macrófagos e estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos, sendo ineficientes contra o parasita, permitindo a progressão e persistência da doença (HAILU et al., 2005; BARBIÉRI, 2006).

A diferenciação para subpopulações de células Th1 e Th2 está relacionada a três fatores: as citocinas presentes no ambiente da estimulação, o tipo de APCs e a natureza e quantidade do antígeno (HAILU et al., 2005). Para Reis et al. (2006), moléculas presentes na saliva do flebótomo atuam suprimindo a resposta inflamatória na pele e na modulação de citocinas, sendo capazes de bloquear a resposta imunológica do tipo Th1 e estimular a do tipo Th2.

Nos animais resistentes à infecção, as APCs produzem Interleucina 12 (IL-12), uma citocina que promove a diferenciação de linfócitos T na subpopulação Th1 (BARBIÉRI, 2006). As citocinas produzidas pela resposta do tipo Th1 influenciam no aumento da produção e proliferação de linfócitos e na atuação citotóxica das células T CD8, mantendo o aspecto clínico saudável no animal (PINELLI et al., 1999).

Por outro lado, nos animais susceptíveis ocorre produção de IL-4, desencadeando a diferenciação de linfócitos T na subpopulação Th2 (BARBIÉRI, 2006). Na resposta Th2 ocorre aumento da produção de citocinas como IL-10 e Fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) que inibem a resposta efetiva Th1, contribuindo para o estabelecimento da infecção (ALVES et al., 2009).

Sendo assim, os animais sintomáticos apresentam, geralmente, uma forte resposta imunológica humoral e imunossupressão da resposta celular específica, enquanto os animais assintomáticos demonstram ter resposta celular específica e fraca resposta humoral. No entanto, é importante reforçar que esta dicotomia não é absoluta, uma vez que alguns cães possuem respostas mistas Th1-Th2, possivelmente consequência da virulência da estirpe do protozoário, dos fatores intrínsecos e extrínsecos característicos do animal e da duração da infecção (SANTOS-GOMES et al., 2008).

Os linfócitos T citotóxicos CD8 estão envolvidos na resistência a doença nos cães, sendo responsáveis pela lise dos macrófagos infectados com *Leishmania* spp. e pelo aumento da síntese de INF-γ e TNF-α (BARBIÉRI, 2006).

As células Treg são subpopulações de linfócitos T CD4 que apresentam atividade supressiva, importante para a manutenção da homeostasia imunológica, por meio da interação célula-célula e/ou pela produção de citocinas como a IL-10 e TGF-β e que, no entanto, poderiam favorecer a sobrevivência do parasita (BELKAID; TARBELL, 2009).

2.3 Alterações clinico-patológicas e sintomatologia clínica

Anteriormente os cães soropositivos para LV eram classificados de acordo com a condição clínica, em assintomáticos (sem sinais clínicos), oligossintomáticos (poucos sinais clínicos aparentes) e sintomáticos (com mais de três sinais clínicos aparentes) (QUEIROZ et al., 2010).

No entanto, para Solano-Gallego e Baneth (2008), a classificação dos cães como assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, baseado apenas no exame físico dos animais, apresenta limitações, pois não considera alterações clínico-patológicas e desconsidera os animais com desordens orgânicas, mas sem sinais clínicos aparentes. Solano-Gallego et al. (2011) propuseram a classificação entre animais assintomáticos (cães sem sintomatologia clínica e alterações clínico-patológicas, mas com infecção por *L. infantum* confirmada por testes sorológico ou molecular) e sintomáticos (cães que apresentam sintomatologia clínica e alterações clínico-patológicas e com infecção confirmada por testes sorológico ou molecular).

Dentre as alterações clínico-patológicas, as mais comuns são hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, diminuição da proporção albumina/globulina, anemia não regenerativa, leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia, proteinuria, enzimas hepáticas elevadas, azotemia renal. Os sinais clínicos da doença são caracterizados por linfadenomegalia generalizada, emagrecimento progressivo, esplenomegalia, hepatomegalia, dermatopatias, conjuntivite, úlceras crostosas na ponta dos pavilhões auriculares, focinho e região periorbital, observa-se também atrofia muscular, desordens neurológicas, onicogrifose, dentre outros (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A onicogrifose é o crescimento demasiado das unhas e está entre os principais achados clínicos em cães infectados por leishmaniose visceral, sendo descrita nas

proporções de 60% (COSTARDI, 2009), 63,1% (ALMEIDA; MENDONÇA; SOUSA, 2010), 82,5% (KOUTINAS et al., 2010), 62% (ANDRADE, 2012), 55% (FIGUEIREDO et al., 2014) dos animais com LV. Esta onicopatia pode decorrer da presença do parasito na matriz ungueal e/ou do não desgaste normal das unhas (ALEXANDRE-PIRES; CORREIA, 2008).

3. REFERÊNCIAS

ALEXANDRE-PIRES, G. M.; CORREIA, J. J. Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In: SANTOS-GOMES, G. M.; FONSECA, P. I. M. (Eds.). **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008. p. 53-68.

ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J; SOUSA, V. R. F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1610-1615, 2010.

ALVES, C. F.; DE AMORIM, I. F.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdã, v. 128, n. 4, p. 349-358, 2009.

ANDRADE, M. M. C. **Células CD4+ FOXP3+ produzem IL-10 no baço de cães com leishmaniose visceral**. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, 2012.

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

BARATA, R. A.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; DIAS, C. L. F.; SILVA, J. C.; PAULA, E. V.; PRATA, A.; MONTEIRO, E. M.; DIAS, E. S. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, an Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 481-487, 2004.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 27, p. 551–589, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. p. 184.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. p. 122.

CARVALHO NETA, A. V.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, F. L.; SANTOS, R. L. Panoftalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 12, n.66, p.52-56, 2007.

COSTARDI, M. L. **Imunohistoquímica em cães positivos para leishmaniose visceral**. 2009. 28 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, S. M.; OTRANTO, D. Quantification of Leishmania infantum DNA in females, eggs and larvae of Rhipicephalus sanguineus. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 4, n. 56, p. 1-4, 2011.

FIGUEIREDO, M. M.; DEOTI, B.; AMORIM, I. F.; PINTO, A. J. W.; MORAES, A.; CARVALHO, C. S.; SILVA, S. M.; ASSIS, A. C.; FARIA, A. M. C.; TAFURI, W. L. Expression of Regulatory T Cells in Jejunum, Colon, and Cervical and Mesenteric Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 82, n. 9, p. 3704-3712, 2014.

FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 105, n. 573-576, p. 11-20, 2010.

HAILU, A.; BAARLE, D.; KNOL, G. J.; BERHE, N.; MIEDEMA, F.; KAGER, P. A. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and symptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani***. Clinical Immunology**, Orlando, v. 117, n. 2, p. 182-191, 2005.

JACINTHO, A. P. P. **Análise da expressão de MMP-2 e MMP-9 na pele de cães com leishmaniose visceral**. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

KOUTINAS, A. F.; CARLOTTI, D. N.; KOUTINAS, C.; PAPADOGIANNAKIS, E. I.; SPANAKOS, G. K.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 572-577, 2010.

MOREIRA, P. R. R.; BANDARRA, M. B.; MAGALHÃES, G. M.; MUNARIB, D. P.; MACHADO, G. F.; PRANDINI, M. M.; ALESSI, A. C.; VASCONCELOS, R. O. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in

dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 196, n. 1-3, p. 149-157, 2013.

MORENO, J. Changing views of Langerhans cell functions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 86-88, 2007.

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P. M. G.; BRUSTERS, M.; MOORE, P. F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 1, p. 237–243, 1999.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; STARKE-BUZETTI, W. A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

REIS, L.; BRITO, M.; SOUZA, M.; PEREIRA, V. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARVALHO, A. T.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, R. C. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdã, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

ROSYPAL, A. C.; TROY, G.C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 4, p. 970–972, 2005.

SANTIAGO, M. E. B.; VASCONCELOS, R. O.; FATTORI, K. R.; MUNARI, D. P.; MICHELIN, A. F.; LIMA, V. M. F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 150, n. 4, p. 283-290, 2007.

SANTOS-GOMES, G. M.; RODRIGUES, O. R.; MARQUES, C. **Resposta imunológica**. In: SANTOS-GOMES, G. M.; PEREIRA DA FONSECA, I. M. Leishmaniose canina. (Eds.). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008. p. 69-82.

SERRANO, A. C. M.; NUNES, C. M.; SAVANI, E. S. M.; D'URIA, S. R. N.; BONELLO, F. L.; VASCONCELOS, R. O.; LIMA, V. M. F.; BRESCIANI, K. D. S. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba, SP – relato de caso. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 76, p. 36-40, 2008.

SILVA, F. S. Patologia e Patogênese da Leishmaniose Visceral Canina. **Revista Trópica: ciências agrárias e biológicas**, São Luís, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdã, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Canine leishmaniosis – a challenging zoonosis. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 18, n. 3, p. 232–241, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.

TOMÁS, A.; ROMÃO, S. F. **Biologia do parasita**. In: SANTOS-GOMES, G. M.; PEREIRA DA FONSECA, I. M. Leishmaniose canina. (Eds.). Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, 2008. p. 7-26.

WILSON, N. S.; VILLADANGOS, J. A. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 82, n. 1, p. 91-98, 2004.

CAPÍTULO 2 – Relação entre as lesões histológicas e a carga parasitária da região ungueal de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

Paulo Henrique Leal Bertolo[a*], Maria Eduarda Bastos Andrade Moutinho da Conceição[a], Pamela Rodrigues Reina Moreira[a], Daniela Bernadete Rozza[b], Rafael Silva Cipriano[c], Lizandra Amoroso[a], Rosemeri de Oliveira Vasconcelos[a]

[a]Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.
[b]Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Rua Clóvis Pestana, n 793, 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil.
[c]Centro de Controle de Zoonoses. Rua Doutor Luiz de Almeida, n 145, 16050-470, Araçatuba, SP, Brasil.
*** Autor para correspondência:** Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Patologia Veterinária. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: henrique_medvet@yahoo.com.br

Resumo – A onicogrifose é um dos principais achados clínicos em cães com Leishmaniose Visceral (LV), porém são escassas as pesquisas com enfoque na região ungueal de cães infectados. O objetivo do presente estudo foi avaliar a região ungueal de cães com LV que apresentaram ou não onicogrifose, por meio das análises histopatológica e imuno-histoquímica. O terceiro dígito dos membros torácico e pélvico foi colhido de 16 cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, sem predileção por sexo, raça ou idade. Os animais foram divididos em dois grupos, cães com onicogrifose (GO; n=7) e sem onicogrifose (GSO; n=9). Os dígitos foram avaliados em quatro regiões (epiderme/derme dorsal, epiderme/derme ventral, matriz ungueal dorsal e matriz ungueal ventral). Todas as lesões observadas (infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração vacuolar dos queratinócitos basais, separação dermo-epidérmica e incontinência pigmentar) estavam presentes em ambos os grupos, porém em maior intensidade nos dígitos de cães com onicrogrifose. A imunomarcação das formas amastigotas de *Leishmania infantum* foi observada nas diferentes áreas do dígito. Observou-se diferença estatística entre as áreas de epiderme/derme dorsal com a matriz dorsal e com a matriz ventral nos dígitos do membro pélvico e, entre a epiderme/derme dorsal com a matriz dorsal no membro torácico do grupo GO. Conclui-se que a principal alteração histopatológica da região ungueal de cães com LV é o infiltrado inflamatório mononuclear independente da presença de onicogrifose. Estes animais apresentaram a presença do parasita na região responsável pelo crescimento da unha. Esta onicopatia parece estar associada à presença do parasita e ao microambiente inflamatório local.

Palavras-chave: cão, leishmaniose visceral, dígito, onicogrifose.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose, amplamente distribuída pelo mundo, que acomete o ser humano, o cão e os animais selvagens (Brasil, 2014), cujo agente etiológico no continente americano é o protozoário *Leishmania infantum* (Baneth et al., 2008). Os mosquitos das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são os vetores que participam na transmissão da doença (Barata et al., 2004). O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* pode albergar o parasita, mas ainda não foi comprovada sua participação na transmissão do parasita (Dantas-Torres et al., 2011).

Os sinais clínicos da LV são variados, tais como, linfadenomegalia generalizada, emagrecimento progressivo, esplenomegalia, hepatomegalia, alterações dermatológicas, lesões oftalmológicas, nefropatias, desordens neurológicas e onicogrifose (Solano-Gallego et al., 2011).

A onicogrifose é o crescimento demasiado das unhas e está entre os principais achados clínicos em cães com LV, sendo descrita na frequência de 63,1% (Almeida et al., 2010), 40% (Koutinas et al., 2010) e 55% (Figueiredo et al., 2014). Alguns autores relacionam o crescimento demasiado das unhas à presença do parasita na matriz ungueal (Baneth et a., 2008). Em um estudo detectou-se fraca amplificação do DNA do parasita no dígito de cão com LV (Koutinas et al., 2010). No entanto, a literatura é escassa quanto ao estudo da patogenia da onicogrifose em cães com LV.

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a região ungueal dos membros torácico e pélvico de cães com LV, que apresentavam ou não onicogrifose, por meio das análises histopatológica e imuno-histoquímica. Paralelamente foi comparada a intensidade das lesões nas diferentes áreas da região ungueal, correlacionando estes achados com a presença de onicogrifose e com a carga parasitária local.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais utilizados neste estudo eram procedentes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba (São Paulo, Brasil), área endêmica para LV. Estes cães foram eutanasiados seguindo a legislação brasileira (Brasil, 2008). O terceiro dígito, dos membros torácicos e pélvicos direitos, foi colhido de 16 cães (n=

32) naturalmente infectados com *Leishmania infantum.* Não houve predileção por sexo, raça ou idade. Os cães foram selecionados por meio do teste sorológico (ELISA) ou por punção aspirativa por agulha fina do linfonodo poplíteo para visualização do parasita. Estes animais foram divididos em dois grupos de cães com onicogrifose (GO; n=7) e sem onicogrifose (GSO; n=9).

Os fragmentos dos dígitos foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (0,15 Molar), pH 7,2, durante 48 horas. Após a fixação, os dígitos inteiros foram descalcificados em solução de ácido nítrico a 10%, durante oito dias. Em seguida foi feita uma secção sagital mediana nos dígitos, utilizando navalha descartável de micrótomo (Figura 1). Os dígitos foram lavados em água corrente por 15 minutos e em solução de bicarbonato de sódio por duas horas e, novamente lavados em água corrente por quatro horas. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em soluções de concentração crescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina de acordo com a técnica histológica de rotina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm e corados com hematoxilina e eosina (HE) (protocolo modificado de Tolosa et al., 2003).

As alterações histopatológicas do dígito, tais como, infiltrado inflamatório mononuclear, degeneração vacuolar dos queratinócitos basais, separação dermo-epidérmica e incontinência pigmentar foram avaliadas em escores de 0-3 (0-ausente, 1-discreto, 2-moderado, 3-acentuado). Os escores foram aplicados em cada área do dígito: epiderme/derme dorsal, matriz ungueal dorsal, matriz ungueal ventral e epiderme/derme ventral (coxim digital), conforme descrito por Koutinas et al. (2010).

Figura 1. Secção sagital mediana do terceiro dígito torácico de cão com leishmaniose visceral. Notar as diferentes áreas do dígito canino. (1) Tendão do músculo flexor profundo dos dedos, (2) Parte da falange média do terceiro dígito, (3) Tendão do músculo extensor profundo dos dedos, (4) Epiderme/derme dorsal, (5) Matriz ungueal dorsal, (6) Parede da unha, (7) Parte da falange distal do terceiro dígito, (8) Matriz ungueal ventral, (9) Epiderme/derme ventral (coxim digital).

A determinação da carga parasitária, nas diferentes áreas do dígito, foi feita por meio da técnica de imuno-histoquímica (modificado de Tafuri et al., 2004). Os tecidos foram desparafinizados em estufa a 60ºC por uma hora e posteriormente hidratados em soluções com concentrações decrescentes de álcool, até a lavagem em água destilada. Posteriormente fez-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de

metanol (Synth) e peróxido de hidrogênio (30 volumes, Synth) a 8%, por 30 minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito com produto comercial (Protein Block, DakoCytomation, Cód. X0909), durante 30 minutos, em câmara úmida a temperatura ambiente. Como anticorpo primário foi utilizado o soro de cão positivo para LV, na diluição de 1:200, com duas horas de incubação a temperatura ambiente. Após, os cortes foram incubados com o complexo de polímeros ligados a peroxidase (kit Advance HRP, DakoCytomation, Cód. K4068). Entre cada um dos passos descritos fez-se banhos em água destilada e em solução tampão Tris HCl, pH 7,4. Para a visualização da reação utilizou-se o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina – DakoCytomation, cód. K3468-1). Os tecidos foram contra-corados com Hematoxilina de Harris e o meio de montagem foi o Entellan (Merck). Como controle positivo foi utilizado linfonodo de cão positivo para LV. O controle negativo foi feito com diluente de anticorpo (Dakocytomation, código S3022), em substituição ao anticorpo primário.

A densidade de células parasitadas por animal foi determinada pela seleção de oito campos microscópicos dos dígitos, com objetiva 40x (área de 0,19625 μm^2), em microscópio Nikon E200, câmara digital Motic de 2,5 megapixels. As médias das contagens das imunomarcações nos campos foram comparadas entre os grupos GO e GSO, entre as diferentes regiões dos dígitos dentro de cada grupo e em cada membro (torácico e pélvico).

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. A comparação entre as diferentes áreas do dígito dentro de cada grupo e em cada membro foi feita pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn. Todas as análises foram feitas no programa GraphPad Prism (versão 6,01), considerando-se as diferenças significativas quando $P<0,05$.

3. RESULTADOS

As principais alterações histopatológicas (Tabela 1) nas quatro áreas do dígito foram infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 2A) constituído por linfócitos, plasmócitos e macrófagos contendo formas amastigotas intracitoplasmáticas de

Leishmania infantum (Figura 2B); degeneração vacuolar de queratinócitos basais; separação dermo-epidérmica (figura 2C) e incontinência pigmentar (Figura 2D).

Tabela 1. Principais alterações histopatológicas encontradas nas diferentes áreas da região ungueal dos dígitos dos membros torácicos e pélvicos de cães com leishmaniose visceral.

Tipo de alteração	Áreas do dígito	Grupo GO		Grupo GSO	
		Frequência (%)	Severidade (mediana)	Frequência (%)	Severidade (mediana)
Intfiltrado inflamatório*	E/D dorsal	14/14 (100)	0-3 (2)	13/18 (72,2)	0-3 (2)
	MD	9/14 (64,2)	0-2 (1)	8/18 (44,4)	0-3 (0)
	MV	12/14 (85,7)	0-3 (1,5)	8/18 (44,4)	0-3 (1)
	E/D ventral	14/14 (100)	0-3 (1)	12/18 (66,6)	0-3 (1)
Degeneração vacuolar**	E/D dorsal	9/14 (64,2)	0-2 (1)	6/18 (33,3)	0-2 (0)
	MD	5/14 (35,7)	0-3 (0)	6/18 (33,3)	0-2 (0)
	MV	6/14 (42,8)	0-2 (0)	7/18 (38,8)	0-2 (0)
	E/D ventral	8/14 (57,1)	0-3 (1)	7/18 (38,8)	0-3 (0)
Separação D/E†	E/D dorsal	3/14 (21,4)	0-1 (0)	4/18 (22,2)	0-3 (0)
	MD	9/14 (64,2)	0-3 (1,5)	7/18 (38,8)	0-3 (0)
	MV	6/14 (42,8)	0-3 (0,5)	5/18 (27,7)	0-2 (0)
	E/D ventral	3/14 (21,4)	0-3 (0)	5/18 (27,7)	0-3 (0)
Incontinência‡	E/D dorsal	5/14 (35,7)	0-3 (0)	2/18 (11,1)	0-3 (0)
	MD	5/14 (35,7)	0-3 (0)	7/18 (38,8)	0-3 (0)
	MV	7/14 (50)	0-3 (1)	5/18 (27,7)	0-3 (0)
	E/D ventral	10/14 (71,4)	0-3 (1)	9/18 (50)	0-3 (0,5)

E/D dorsal (Epiderme/derme dorsal); MD (Matriz ungueal dorsal); MV (Matriz ungueal ventral); E/D ventral (Epiderme/derme ventral). *Infiltrado inflamatório mononuclear; **Degeneração vacuolar dos queratinócitos basais; †Separação da junção dermo-epidérmica; ‡Incontinência pigmentar

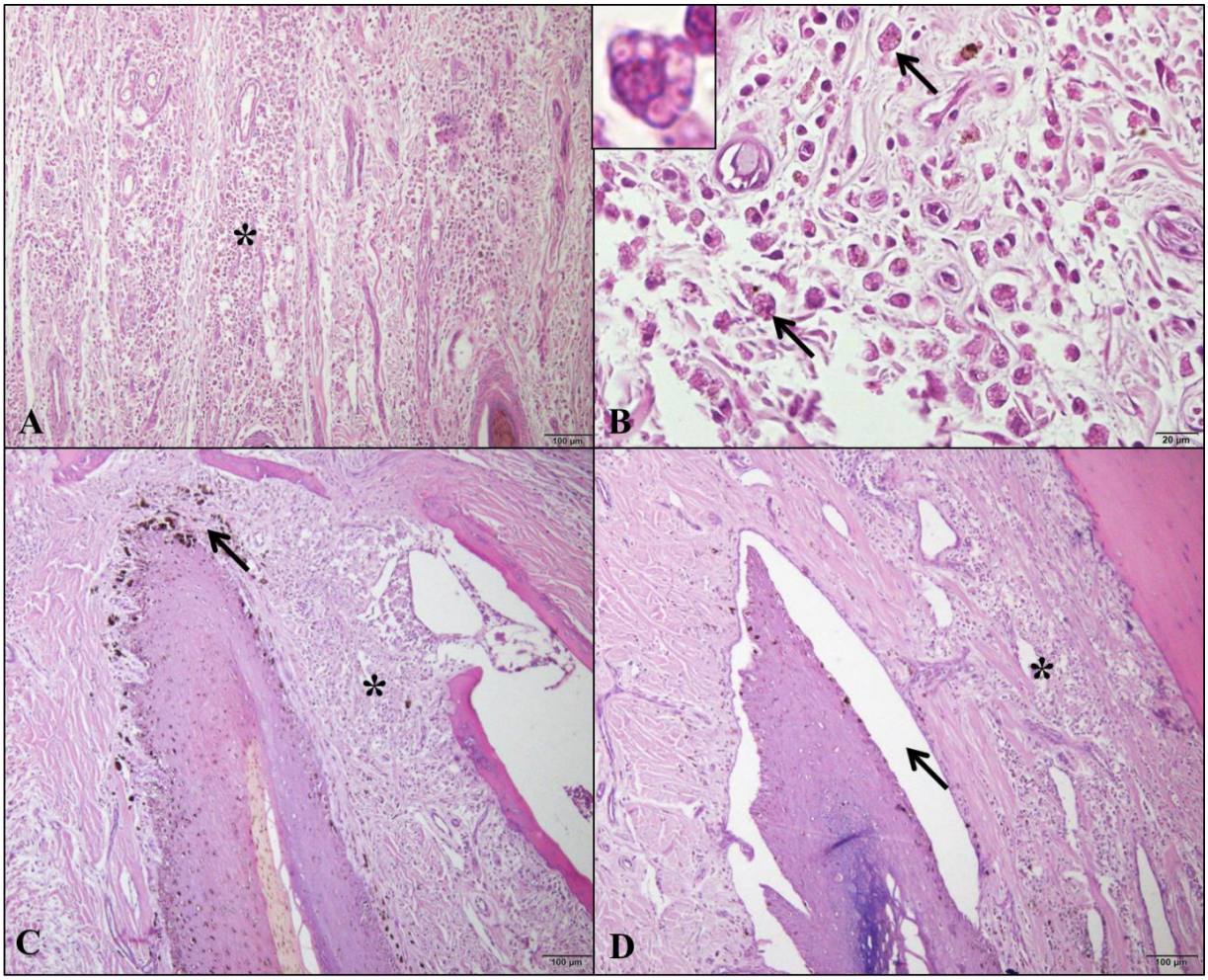

Figura 2. Fotomicrografias das alterações histopatológicas nas diferentes áreas do dígito de cão com leishmaniose visceral. (A) Infiltrado inflamatório (*) distribuído de forma difusa na epiderme/derme dorsal (barra=100µm). (B) Na mesma área observa-se Infiltrado inflamatório contendo macrófagos com formas amastigotas de *Leishmania* spp. (setas e detalhe, barra=20µm). (C) Infiltrado inflamatório (*) e incontinência pigmentar (seta), presentes na matriz ungueal dorsal (barra=100µm). (D) Infiltrado inflamatório (*) e separação dermo-epidérmica acentuada (seta) na matriz ungueal ventral (barra=100µm). Hematoxilina e Eosina.

Na análise imuno-histoquímica verificou-se a imunomarcação citoplasmática de formas amastigotas de *Leishmania infantum* nas diferentes áreas do dígito (Figura 3).

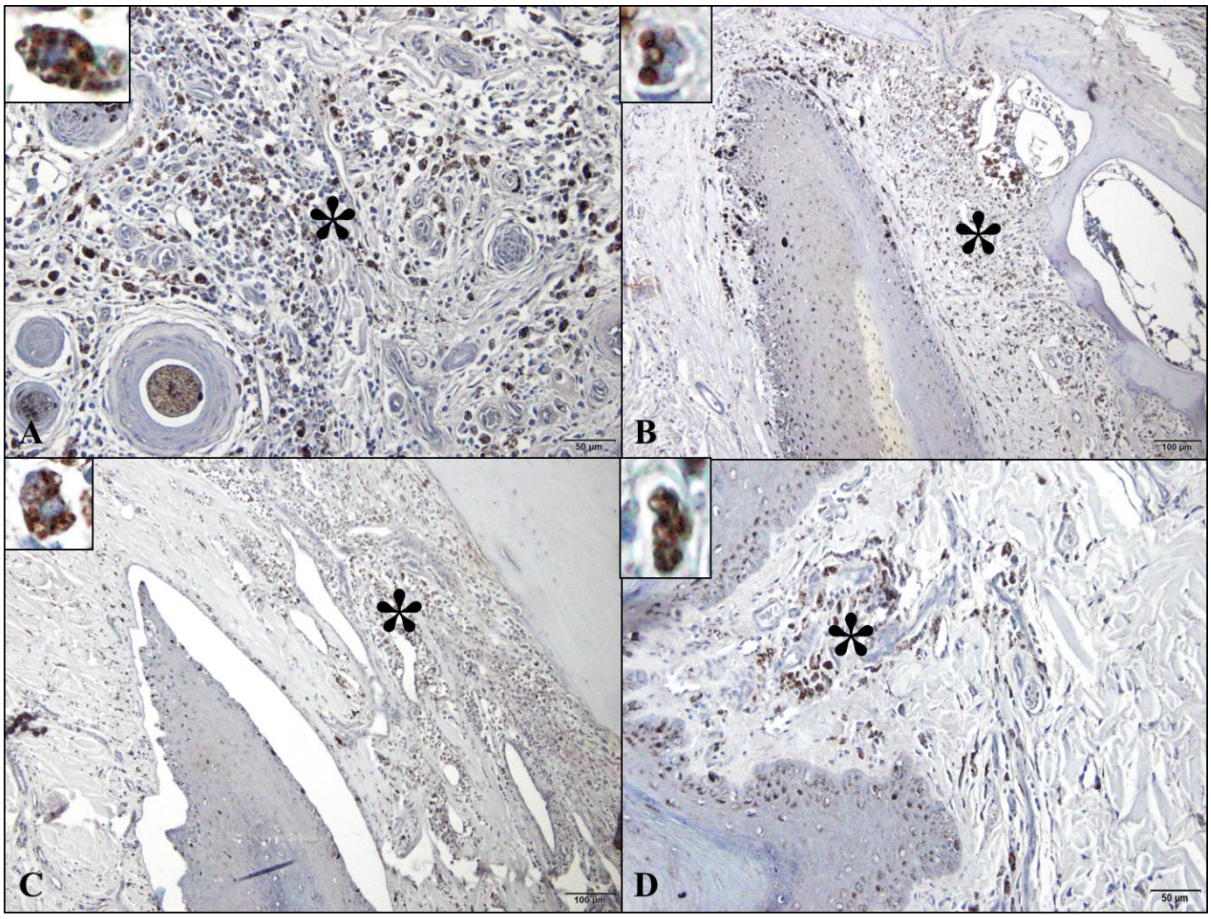

Figura 3. Fotomicrografias das imunomarcações das formas amastigotas de *Leishmania infantum* no dígito de cães com leishmaniose visceral. (A) Notar a detecção do parasito no citoplasma de macrófagos na epiderme/derme dorsal (*; detalhe; barra=50µm). (B) Macrófagos parasitados presentes na matriz ungueal dorsal (*; detalhe; barra=100µm). (C) Presença do parasito na matriz ungueal ventral (*; detalhe; barra=100µm). (D) Focos com macrófagos parasitados na epiderme/derme ventral (coxim digital) (*; detalhe; barra=100µm). Complexo de polímeros ligados à peroxidase.

Não foi observada diferença entre os grupos, em cada membro (membro torácico, p=0,739 e membro pélvico, p=0,450, Teste de Mann-Whitney / Figura 4); entre as áreas do dígito torácico e pélvico do grupo GSO (membros torácico, p=0,476 e pélvico, p=0,256; Teste de Kruskal-Wallis e de Dunn / Figura 5) e entre cada área dos dígitos torácico (p>0,999) e pélvico (p>0,999) entre os grupos (Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn / Figura 6). Entretanto houve diferença entre as áreas do dígito torácico e pélvico do grupo GO (p=0,004; Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn)

observada entre a epiderme/derme dorsal e matriz ungueal dorsal no membro torácico. No membro pélvico (p=0,020; Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn) as diferenças foram observadas entre epiderme/derme dorsal e matriz ungueal dorsal, e entre epiderme/derme dorsal e matriz ungueal ventral (Figura 7).

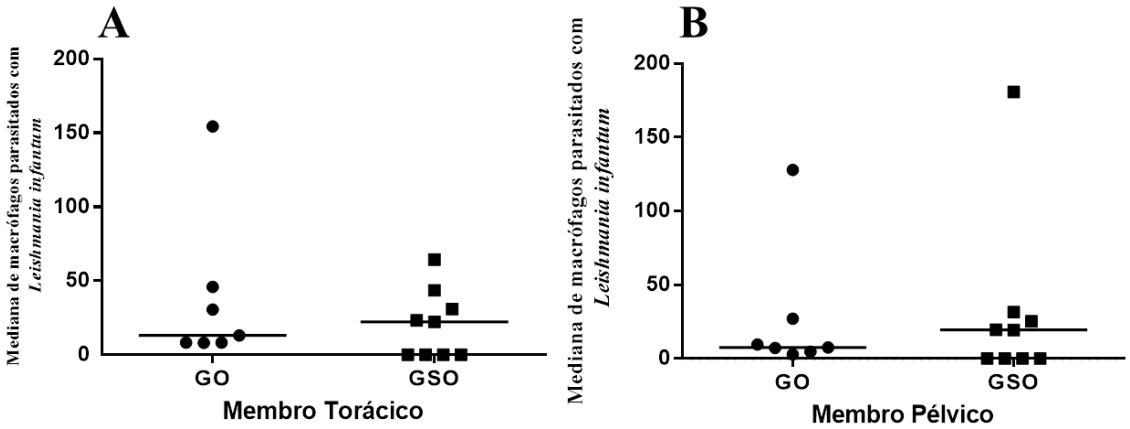

Figura 4. Medianas da carga parasitária observadas na comparação entre os grupos. (A) membro torácico (p=0,739) e (B) membro pélvico (p=0,450). Grupo com onicogrifose (GO) e sem onicogrifose (GSO). Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

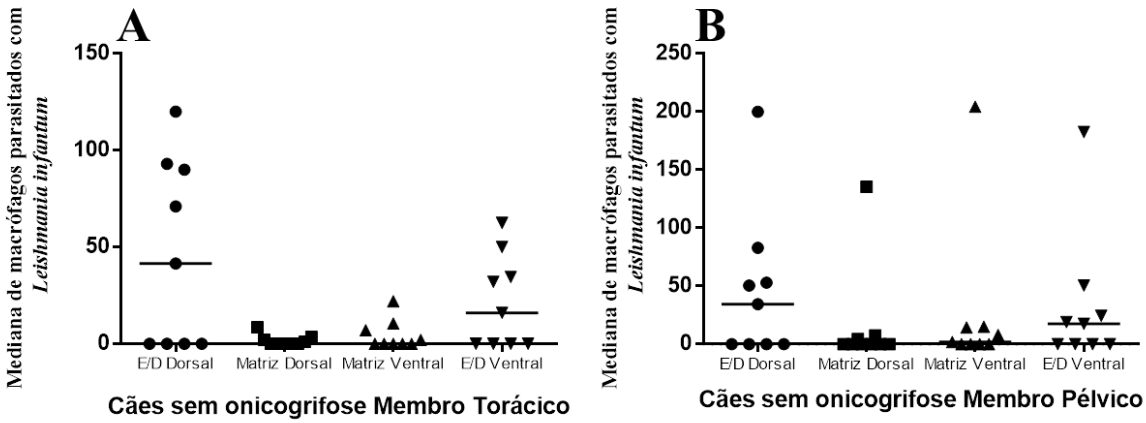

Figura 5. Medianas da carga parasitária observadas na comparação entre as áreas distintas do dígito de animais sem onicogrifose (GSO). (A) membro torácico (p=0,476) e (B) membro pélvico (p=0,256). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

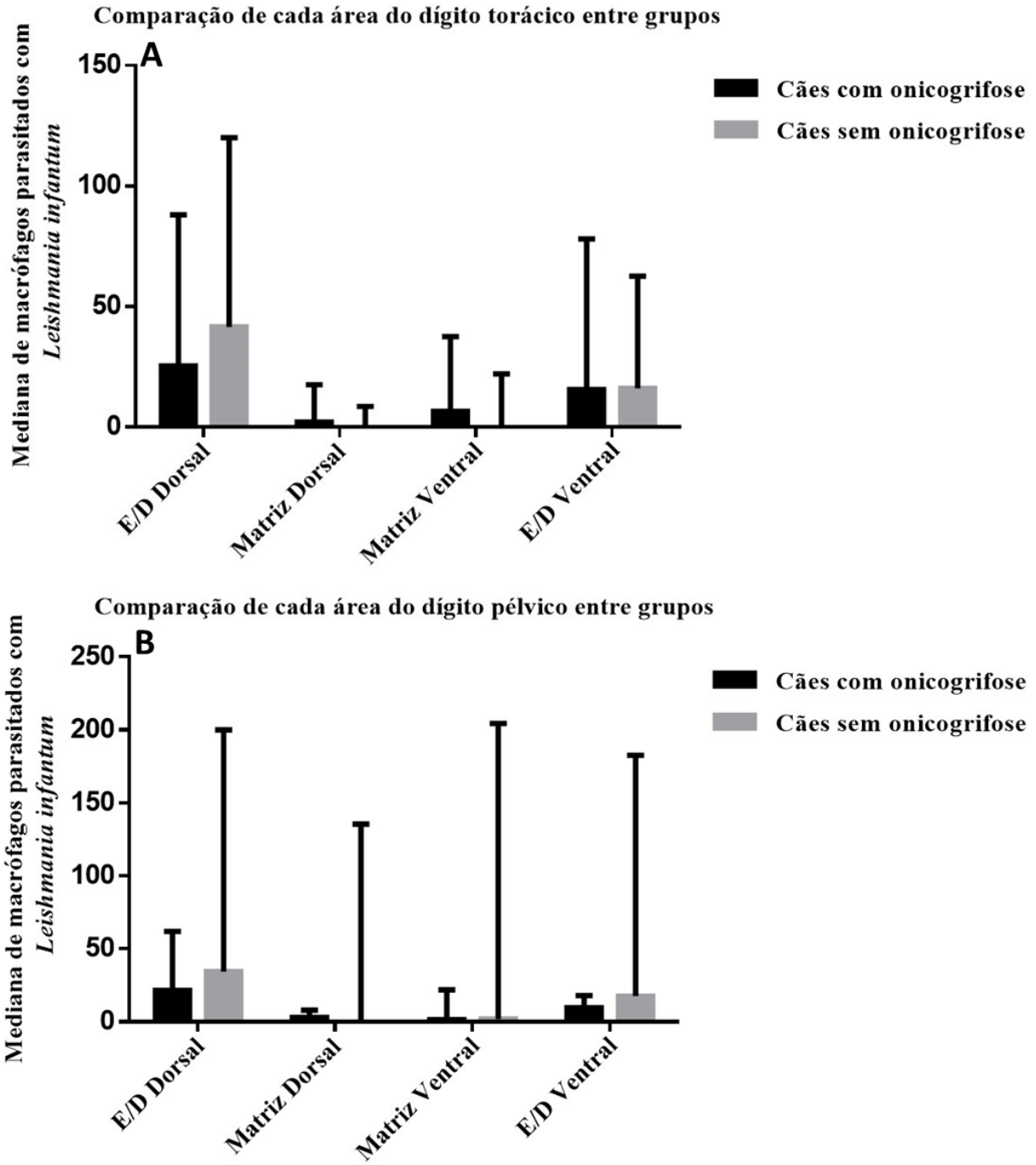

Figura 6. Medianas da carga parasitária observadas na comparação entre as áreas distintas do dígito entre os grupos. (A) membro torácico (p>0,999) e (B) membro pélvico (p>0,999). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

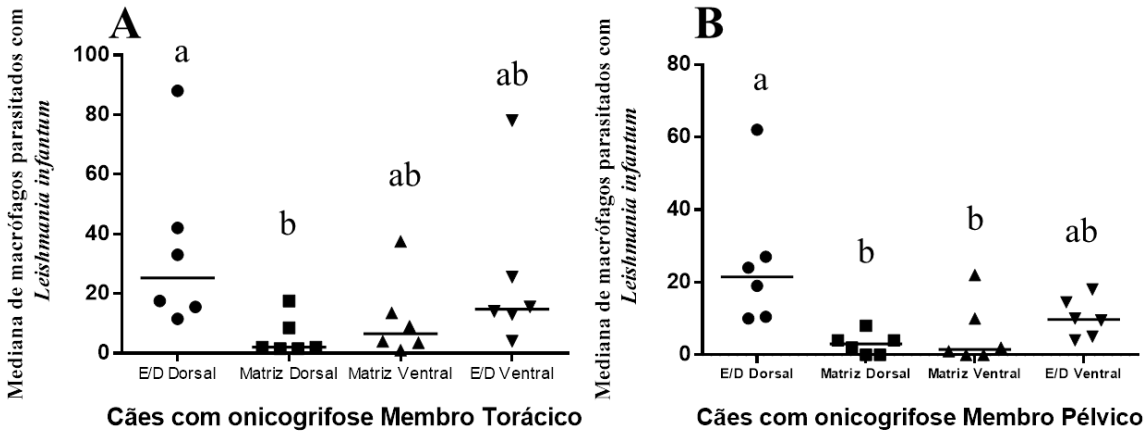

Figura 7. Medianas da carga parasitária observadas na comparação entre as áreas distintas do dígito de animais com onicogrifose (GO). (A) membro torácico (p=0,004) e (B) membro pélvico (p=0,020). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

4. DISCUSSÃO

A onicogrifose em cães pode estar relacionada a alterações de origem bacteriana, fúngica ou parasitária, traumas, doenças sistêmicas, proliferativas e imunomediadas (Costa e Belli, 2011). Além disso, esta onicopatia pode ser observada em associação à paroníquia de etiologia variada (Carlotti, 1999; Scott et al., 2001). No presente estudo, não foi observado paroníquia em nenhum dos cães com onicogrifose corroborando com Koutinas et al. (2010).

Dentre as alterações histopatológicas na região ungueal dos cães do presente estudo, observou-se que a dermatite crônica foi mais representativa nas quatro áreas do dígito dos animais com onicogrifose e um pouco menos frequente nos animais sem onicogrifose. A onicogrifose parece está relacionada com o processo inflamatório (Baneth et al., 2008), no entanto os animais do grupo GSO não desenvolveram esta onicopatia. Para Scott et al. (2001) isto pode ser explicado pelo tempo que pode levar para que a onicogrifose seja clinicamente aparente após iniciada a injúria tecidual e resposta inflamatória na derme da unha.

Na avaliação histopatológica de cães com unhas saudáveis pode-se observar vacúolos intranucleares nas células basais (Mueller et al., 1993), que difere da degeneração vacuolar dos queratinócitos basais encontrada neste estudo. A degeneração vacuolar dos queratinócitos basais foi mais frequente nos animais do

grupo GO em relação aos animais do grupo GSO, diferindo de Koutinas et al. (2010) que encontraram a mesma alteração na metade dos animais avaliados, independente de possuirem ou não onicogrifose. Esta alteração é consequência da agressão aos queratinócitos basais, quando estes não podem manter a homeostasia normal. Estas células vacuolizadas podem resultar na formação de fissura entre a epiderme e a derme (Hargis e Ginn, 2013).

A separação dermo-epidérmica foi mais frequente nos animais do grupo GO, principalmente nas áreas da matriz ungueal dorsal e matriz ungueal ventral. Mueller et al. (1993) também observaram essa alteração em cães saudáveis com frequência de 40% na matriz ungueal dorsal e 15% na matriz ungueal ventral e estes autores atribuíram a artefatos de processamento. O tempo de descalcificação das amostras destes autores e do presente estudo foi semelhante (oito dias). No entanto, Koutinas et al. (2010) utilizaram período de descalcificação de 40 dias para diminuir artefatos no corte das amostras e encontraram frequências dessa alteração próximas às do presente estudo. Logo, sugere-se que esta alteração parece ocorrer nos casos de LV canina devido, ao enfraquecimento da junção dermo-epidérmica.

Neste estudo observou-se maior frequência de incontinência pigmentar nos animais do grupo GO, enquanto Koutinas et al. (2010) observaram igualmente em cães com LV que possuíam ou não onicogrifose. Koutinas et al. (1992) também observaram esta alteração na dermatite esfoliativa em cães com LV. Para Hargis e Ginn (2013) a incontinência pigmentar ocorre devido lesão inespecífica associada à inflamação, sendo observada em doenças que danificam as células basais ou os melanócitos, como o lúpus eritematoso. Sendo assim, esta alteração pode ser observada na resposta inflamatória da LV.

A imunomarcação de amastigotas de *Leishmania infantum* foi evidenciada nas quatro áreas do dígito. Sendo predominantemente observada na região epiderme/derme dorsal, seguida da epiderme/derme ventral, matriz ungueal ventral e matriz ungueal dorsal. Na comparação entre as áreas dos dígitos torácico e pélvico do grupo GO, houve diferença significativa entre epiderme/derme dorsal com a matriz ungueal dorsal (membro torácico) e entre epiderme/derme dorsal com a matriz ungueal ventral (membro pélvico). Essas diferenças podem sugerir que a epiderme/derme dorsal é uma região de fácil acesso para o inseto vetor.

Este é o primeiro estudo que demonstra formas amastigotas de *Leishmania infantum* na região ungueal de cães com LV pelas análises de HE e imuno-histoquímica. Para Mueller et al. (2004), o processo de descalcificação, mesmo quando aplicado por curto período de tempo (dois dias) resulta na desnaturação de proteínas e possível falha na técnica de imuno-histoquímica. Koutinas et al. (2010) atribuíram o insucesso da análise por HE e imuno-histoquímica em seus estudos ao processo de descalcificação que durou 40 dias, mesmo assim conseguiram amplificar bandas fracas do DNA de *Leishmania* spp. (PCR), na região ungueal de cães com LV. No entanto, estes autores não informam o tempo de fixação, tamanho da amostra, agente neutralizador do descalcificador. Ambos utilizaram ácido fórmico como agente descalcificador, enquanto no presente estudo foi utilizado ácido nítrico e bicarbonato de sódio como agente neutralizador da reação. Portanto, sugere-se que a falha nas imunomarcações de outros estudos está relacionada a estas diferenças no protocolo de descalcificação.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a principal alteração histopatológica, da região ungueal de cães com LV, foi o infiltrado inflamatório mononuclear na região de epiderme/derme dorsal independentemente da presença de onicogrifose. Estes animais apresentaram carga parasitária na região responsável pelo crescimento da unha. Esta onicopatia não parece estar associada apenas à presença do parasita, mas também ao microambiente inflamatório local, que pode estar contribuindo com a onicogrifose pela liberação de mediadores inflamatórios no local.

Cumprimento aos padrões éticos: O presente estudo com os animais foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (CEUA-UNESP), Câmpus de Jaboticabal, sob nº Protocolo 11976/15.

Agradecimentos: O suporte financeiro deste estudo foi disponibilizado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; no. 2013/00763-4). P.H.L. Bertolo foi bolsista da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior). Os autores agradecem ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (São Paulo, Brasil) por disponibilizar os animais deste estudo.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

6. REFERÊNCIAS

Almeida, A.B.P.F., Mendonça, A.J., Sousa, V.R.F., 2010. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Cienc. Rural. 40, 1610-1615.

Baneth, G., koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part one. Trends Parasitol. 24, 324-330.

Barata, R.A., Silva, J.C.F., Costa, R.T., Dias, C.L.F., Silva, J.C., Paula, E.V., Prata, A., Monteiro, E.M., Dias, E.S., 2004. Phlebotomine sand flies in porteirinha, an area of american visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99, 481-487.

Brasil, Ministério da Saúde. (ed.), 2008. Portaria interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008-Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministério da Saúde, Brasília, 2 pp.

Brasil, Ministério da Saúde. (ed.), 2014. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Ministério da Saúde, Brasília, 120 pp.

Carlotti, D.N., 1999. Claw disease in dogs and cats. Eur. J. Companion Anim. Pract. 9, 21-33.

Costa, S.S., Belli, C.B., 2011. Onicopatias em cãe e gatos. Clin. Vet. 16, 46-56.

Dantas-Torres, F., Latrofa, S.M., Otranto, D., 2011. Quantification of Leishmania infantum DNA in females, eggs and larvae of Rhipicephalus sanguineus. Parasit. Vectors. 4, 56.

Figueiredo, M.M., Deoti, B., Amorim, I.F., Pinto, A.J.W., Moraes, A., Carvalho, C.S., Silva, S.M., Assis, A.C., Faria, A.M.C., Tafuri, W.L., 2014. Expression of regulatory T cells in jejunum, colon, and cervical and mesenteric lymph nodes of dogs naturally infected with Leishmania infantum. Infect. Immun. 82, 3704-3712.

Hargis, A.M., Ginn, P.E., 2013. O tegumento. In: Zachary, J.M., McGavin, M.D. (Eds.), Bases da patologia em veterinária. Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 975-1087.

Koutinas, A.F., Scott, D.W., Kontos, V., Lekas, S., 1992. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. Vet. Dermatol. 3, 121-30.

Koutinas, A.F., Carlotti, D.N., Koutinas, C., Papadogiannakis, E.I., Spanakos, G.K., Saridomichelakis, M.N., 2010. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with Leishmania infantum. Vet. Dermatol. 21, 572-577.

Mueller, R.S., Sterner-Kock, A., Stannard, A.A., 1993. Microanatomy of the canine claw. Vet. Dermatol. 4, 5-11.

Mueller, R.S., West, K., Bettenay, S.V., 2004. Immunohistochemical evaluation of mononuclear infiltrates in canine lupoid onychodystrophy. Vet. Pathol. 41, 37-43.

Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E., 2001. Claw diseases. In: Muller & Kirk's (Eds.), Small Animal Dermatology. W.B.Saunders, Philadelphia, pp. 1190-1200.

Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasit. Vectors. 4, 86.

Tafuri, W.L., Santos, R.L., Arantes, R.M.E., Gonçalves, R., Melo, M.N., Michalick, M.S.M., Tafuri, W.L., 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J. Immunol. Methods. 292, 17-23.

Tolosa, E.M.C., Rodrigues, C.J., Behmer, O.A., Freitas-Neto, A.G., 2003. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Manole, São Paulo, 331 pp.