

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA DO CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA E
CAMPUS EXPERIMENTAL DE DRACENA

ESTUDO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES E
POLIMORFONUCLEARES NO INTESTINO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum*

Diogo Tiago da Silva

Biólogo

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA DO CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA E
CAMPUS EXPERIMENTAL DE DRACENA

ESTUDO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES E
POLIMORFONUCLEARES NO INTESTINO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum*

Diogo Tiago da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Câmpus de Ilha Solteira como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

S586e Silva, Diogo Tiago.
Estudo das células mononucleares e polimorfonucleares no intestino de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* / Diogo Tiago Silva. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2015
185 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Produção Animal, 2015

Orientador: Wilma Aparecida Starke Buzetti
Inclui bibliografia

1. Cão. 2. Células granulocíticas. 3. Leishmaniose visceral. 4. Monocitos. 5. Trato intestinal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Estudo das células mononucleares e polimorfonucleares no intestino de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

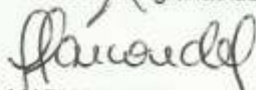
AUTOR: DIOGO TIAGO DA SILVA

ORIENTADORA: Profa. Dra. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal, Área: PRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira


Prof. Dr. WILLIAN MARINHO DOURADO COELHO
Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina


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

Data da realização: 03 de março de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DIOGO TIAGO DA SILVA – nascido em 26 de maio de 1990, no município de Adamantina, Estado de São Paulo. Em sua formação superior, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS. Durante o período de março de 2008 a dezembro de 2012 foi estagiário de iniciação científica sob a supervisão da Profa. Dra. Wilma Aparecida Stake Buzetti, trabalhando com imunoparasitologia relacionada à leishmaniose visceral canina. Foi bolsista FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo) entre outubro de 2009 a outubro de 2012 onde desenvolveu trabalhos científicos divulgados em anais de congressos internacionais, nacional e em revistas indexadas. Em 2013 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal (PPGCTA), nível mestrado, pela mesma Universidade em que se graduou e, atualmente, é bolsista FAPESP por esse programa. Em seu *currículo*, disponível na plataforma Lattes, constam as atividades desenvolvidas ou realizadas durante a graduação e a pós-graduação.

EPÍGRAFE

“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos.

A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.

A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos.

TUDO BEM!

O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum, é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.

Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos”.

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Claudinei da Silva e Evanete Coelho Marcelino da Silva** por todo carinho e amor. Com certeza são os melhores pais do mundo. Os valores ensinados refletem hoje no meu amor incondicional. Eu AMO vocês.

À minha querida irmã **Elaine Aparecida da Silva Cassachia**. Por toda a admiração que lhe dedico, pela facilidade em observar os lados positivos, por todo zelo que me tens. Amo você.

À minha orientadora Profa. Dra. **Wilma Aparecida Starke Buzetti**, pelos anos de dedicação, desde a minha iniciação científica até aqui, certamente com você aprendi muito e sou grato pelas conversas e desafios interpostos. Obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser presente em minha vida!

Aos animais utilizados nesse trabalho, meu respeito e gratidão.

À Universidade Estadual Paulista – Unesp, campus de Ilha Solteira, e em especial ao Departamento de Biologia e Zootecnia (DBZ).

Agradeço ao programa de pós-graduação Ciência em Tecnologia Animal (PPGCTA), pela oportunidade aqui em representá-lo.

Agradeço a minha orientadora, Wilma Aparecida Starke Buzetti, a quem também dedico esse trabalho, por toda ajuda ao longo dos anos.

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisas no Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa e auxílio referente ao processo 2013/13875-5.

Agradeço aos companheiros do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, em especial aos Médicos Veterinários, Antonio Carlos Faconti Noronha Júnior, e Paulo Rogério Dobre, a ajuda de vocês foi indispensável para à concretização dessa pesquisa. “Carlinhos” muito obrigado por me acordar; todas as suas ligações “*Diogo, tem animal, acorda*” soavam como alívio a cada dia. Agradeço também aos assistentes, “Carranza”, “Xibiu” e Paulo, sou muito grato pelo apoio, e por me esperar finalizar as coletas quando acabava o expediente.

Agradeço à APAISA (Associação Protetora de Animais de Ilha Solteira) e, em especial ao Marcelo Cilim, pelo brilhante trabalho que desenvolve na Associação, e por toda disponibilidade e solicitude em ajudar-nos. Marcelo, o mundo precisa de homens como você, que faz a diferença local.

Agradeço aos docentes e servidores técnicos da UNESP de Ilha Solteira e Dracena.

Agradeço a técnica de Laboratório Elisângela “Elis”, pelo auxílio nas coletas.

Agradeço ao professor Dr. Willian Marinho Dourado Coelho, pela ajuda e amizade.

Ao professor Dr. Alan Rodrigo Panosso e professora Dra. Mara Lúcia Martins Lopes pelo auxílio nas análises estatísticas.

Agradeço ao Comitê de Ética e Bem Estar Animal - CEUA, unidade de Ilha Solteira, que avaliou a proposta e julgou procedente dentro dos conceitos de ética.

Agradeço aos companheiros do LIP AIS (Laboratório de Imunoparasitologia de Ilha Solteira), Marina Flóro e Silva (poia), Maria Luana Alves (M. L), Aline Cristine da Silva (joinha), Juliane Mattos, Maria Fernanda Alves Martin (M. F), Mirian dos Santos Paixão, Michely da Silva Tenório e Silvana Paulan, por todo apoio, ajuda e empenho e pelos bons momentos de risada. Valeu Silvana por me acolher e me iniciar no mundo da pesquisa logo na segunda semana de aula na faculdade.

Agradeço ao bom amigo Júlio Cesar Pereira Spada, por acompanhar todas as coletas e por demonstrar tanto amor à profissão que escolheu para a vida, com certeza faz toda a diferença para quem o acompanha. Muito obrigado por tudo e conte comigo!

Agradeço à Maria Luana Alves (M.L) por ser uma parceira incrível de pesquisa, que com muita paciência e seriedade sempre se mostrou disposta a ajudar.

Agradeço às minhas primas, Karina Ap. da Silva e Aline Cristine da Silva (joinha). Aline valeu pela parceria, por ser minha companheira de tantos anos dividindo o aluguel e, compartilhando de inumeros momentos desde a graduação até aqui. Sim você é demais.

Agradeço à Andrea Ferreira Gonçalves (lesma), foram muitas risadas com você, e depois que foi embora ficaram as lembranças de seus trejeitos que também nos propiciam muita alegria.

Agradeço à Marina Flóro e Silva (poia), por toda ajuda e amizade e por estar sempre apta aos desafios propostos, se mostrando sempre persistente.

Agradeço aos amigos que a vida me presenteou, Aline Gouveia (pomba), Fernando Puertas (Perdidão), Murilo Queiroz (torto), Janaina Rodrigues (rai, jana), Bianca Machado (pônei), Pedro Mainardi (curió), Thais Garcia (thathá), Érica Mariana, Elza Militão, levarei vocês comigo por toda a vida, valeu cada palavra de incentivo, cada desabafo. Valeu a presença, cumplicidade e a amizade de vocês.

Agradeço aos meus familiares, avós, tias e tios, primas e primos, vocês fazem parte desse sonho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	28
1 INTRODUÇÃO	28
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1 Leishmaniose visceral canina: aspectos gerais	29
2.2 Alterações no intestino.....	33
2.3 Neutrófilos.....	34
2.4 Macrófagos	36
2.5 Células dendríticas	38
2.6 Eosinófilos.....	39
2.7 Mastócitos.....	41
2.8 Linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	42
2.9 Fator de Transcrição FOXP3 ⁺	43
3 JUSTIFICATIVA.....	45
4 OBJETIVOS.....	46
4.1 Objetivo geral do trabalho.....	46
5 REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO 2.....	57
1 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
1.1 Animais e local.....	60
1.2 Diagnóstico de LVC para eutanásia.....	60
1.3 Autorização para coletas e aprovação do Comitê de Ética.....	61

1.4	Anamnese e exames clínicos	61
1.5	Eutanásia e necropsia	62
1.6	Coleta de amostras biológicas	62
1.7	Histologia	63
1.7.1	Histoquímica – coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E)	63
1.7.2	Imunoistoquímica - IMIQ	63
1.8	Exames sorológicos – confirmação do diagnóstico	64
1.8.1	Imunoensaio enzimático indireto (ELISA).....	64
1.8.2	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	65
1.9	Exame molecular: Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	66
1.9.1	Extração do DNA do sangue e do tecido.....	66
1.9.2	Amplificação do DNA – Região do cinetoplasto	67
1.10	Análises coprológicas e do conteúdo intestinal	67
1.11	Formação dos grupos	68
2	RESULTADOS	69
3	REFERÊNCIAS	71
CAPÍTULO 3.....		76
1	INTRODUÇÃO.....	79
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1	Animas e local.....	80
2.2	Anamnese e exames clínicos	81
2.3	Diagnóstico de LVC e eutanásia pelo CCZ.....	81

2.4	Coleta e preparo das amostras teciduais.....	81
2.5	Histoquímica	82
2.6	Imunoistoquímica.....	82
2.7	Grupos experimentais	83
2.8	Determinação da positividade e das regiões analisadas	83
2.9	Escores das variáveis	83
2.10	Delineamento estatístico	85
3	RESULTADOS.....	86
3.1	Intensidade parasitária.....	86
3.2	Alterações microscópicas na mucosa intestinal com <i>L. infantum</i>	87
3.3	Outras alterações relevantes	89
3.4	Comparação e correlação clínica e parasitária	89
4	DISCUSSÃO.....	93
4.1	Intensidade parasitária e histopatologia.....	93
4.2	Comparação e correlação clínica e parasitária	96
5	CONCLUSÕES.....	102
6	REFERÊNCIAS	102
CAPÍTULO 4.....		115
1	INTRODUÇÃO	118
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	121
2.1	Animais e local.....	121
2.2	Diagnóstico para LVC e eutanásia.....	121
2.3	Coleta e preparo das amostras teciduais.....	122

2.4	Histoquímica	122
2.5	Imunoistoquímica	123
2.6	Quantificação celular	123
2.7	Grupos experimentais	124
2.8	Delineamento estatístico	124
3	RESULTADOS	124
3.1	Neutrófilos	125
3.2	Eosinófilos	126
3.3	Mastócitos	127
3.4	Correlação entre os três tipos celulares	128
4	DISCUSSÃO	130
4.1	Avaliação das células: neutrófilos, eosinófilos e mastócitos	130
4.2	Atividades imunossupressoras e imunorreguladoras	133
4.3	Correlação entre neutrófilos, eosinófilos e mastócitos	134
5	CONCLUSÕES	135
6	REFERÊNCIAS	135
	CAPÍTULO 5	149
1	INTRODUÇÃO	152
2	MATERIAL E MÉTODOS	155
2.1	Animais e local	155
2.2	Diagnóstico para LVC e eutanásia	155
2.3	Coleta e preparo das amostras teciduais	155
2.4	Histoquímica	156

2.5	Imunoistoquímica.....	156
2.6	Grupos experimentais.....	157
2.7	Semiquantificação das células imunomarcadas	158
2.7.1	Amastigotas de <i>L. infantum</i>	158
2.7.2	Linfócitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e macrófagos	158
2.8	Delineamento estatístico.....	158
3	RESULTADOS.....	159
3.1	Linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	159
3.2	Macrófagos	161
3.3	Análises de Correlação.....	162
4	DISCUSSÃO.....	162
5	CONCLUSÕES.....	169
6	REFERÊNCIAS	170

AUTORIZAÇÃO DA DIRETORIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE ILHA SOLTEIRA



PREFEITURA MUNICIPAL DE ILHA SOLTEIRA

Estado de São Paulo

**DIRETORIA MUNICIPAL DE SAÚDE
GRUPO TÉCNICO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**

Ilha Solteira
novos energia, novos forja

Ilha Solteira, 29 de Fevereiro de 2012.

OFÍCIO Nº 016/2012.

DA: VIGILÂNCIA SANITÁRIA E EPIDEMIOLÓGICA

PARA: PROF. DR. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

UNESP - ILHA SOLTEIRA -SP

Prezada Senhora,

Vimos por meio deste informar a Vossa Senhoria que esta autorizada a participação de alunos no processo de eutanásia dos cães positivos para Leishmaniose Visceral e retirada de materiais biológicos conforme foi solicitado no ofício BZ 004/WASB de 13/02/2012.

Sendo só para o momento despeço-me.

Atenciosamente,

Márcia Regina da Silva Rubio
Chefe do Setor de Vigilância Sanitária e Epidemiológica

RECEBIDO - 29-Fev-2012-11:54-401207-1/2

Visto:

Elaine Aparecida Silva Kishimoto
Diretora Municipal de Saúde

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 06/2014/CEUA, referente ao projeto "Correlação do perfil de células granulocíticas e monocíticas no intestino de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia da UNESP/Ilha Solteira.

Ilha Solteira, 10 de setembro de 2014

Prof. Dr. Antonio Carlos de Laurentiz
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira
Cursos: Agronomia, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica, Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia.
Avenida Brasil Centro, 56 Caixa Postal 31 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil
pabx (16) 3743 1000 fax (16) 3742 2735 scem@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo descritivo sobre o perfil das células granulocíticas e monocíticas na mucosa intestinal de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, na presença ou na ausência do parasita no intestino. Além disso, realizou-se um estudo de correlação entre a intensidade parasitária e os fatores clínicos do hospedeiro, as células envolvidas e as alterações histopatológicas da parede intestinal. Dos 39 cães avaliados, somente 20 foram utilizados no estudo, sendo, 17 positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) e três negativos. Os animais com LVC foram eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, SP, Brasil, e os negativos vieram a óbito natural por motivos diversos. As técnicas de histoquímica e imunoistoquímica foram utilizadas para marcar as células estudadas, identificar as amastigotas de *Leishmania* e auxiliar nas análises histopatológicas do trato intestinal. Os cães foram divididos em três grupos (G1, G2 e G3). Oito cães positivos para LVC e com amastigotas de *L. infantum* no intestino foram selecionados para o grupo G1; nove cães positivos para LVC sem amastigotas intestinais para o grupo G2 e, três cães negativos compuseram o grupo controle (G3). Todos os animais não apresentaram coinfeção parasitária gastrintestinal, mediante exames coproparasitológicos realizados *in vivo* ou *pos-mortem*. As variáveis clínicas dos animais, a intensidade parasitária e a presença das células mononucleares (linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos) foram avaliadas por uma classificação semiquantitativa baseada em escores que variaram de 1 a 4. Já as células granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) foram quantificadas na mucosa (unidade de vilo e cripta - UVC), submucosa e na muscular. Para as análises de comparação entre os grupos (G1, G2 e G3), o teste de Kruskal-Wallis foi empregado para avaliar as variáveis clínicas, o teste t para células granulocíticas, e o teste de Duncan para comparar as células monocíticas. As análises de correlação foram baseadas no teste de Spearman (dados semiquantitativos) e no coeficiente de correlação linear de Pearson (dados quantitativos). Formas amastigotas de *L. infantum* foram detectadas em 40% dos animais (8/20) e estavam distribuídas na lâmina própria da mucosa (vilosidades e criptas), submucosa e na camada muscular do intestino delgado e na mucosa e submucosa do intestino grosso. A reação inflamatória mais destacada no grupo G1 foi caracterizada por infiltrado crônico de células mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Embora os cães do grupo G1 estivessem mais clinicamente comprometidos, não diferiram estatisticamente do grupo G2 em todas as variáveis estudadas, principalmente ao nível da mucosa intestinal, mas apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo (G3). Além disso, no grupo G1, houve correlação positiva e significativa entre a intensidade parasitária, as alterações estruturais microscópicas da mucosa e os sinais clínicos sistêmicos. De acordo com a análise das células granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos e mastócitos), foi observado um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos animais do grupo G2, seguido pelos animais do grupo G1, em relação aos controles. Os polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) apresentaram-se em maior quantidade no intestino delgado do que no intestino grosso. Já os mastócitos e eosinófilos apresentaram correlação positiva entre si por todo o trato intestinal. As células T CD4⁺ foram pouco expressivas nos três grupos avaliados, não apresentando diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre eles. No entanto, ocorreu aumento significativo

de linfócitos T CD8⁺ e de macrófagos no grupo G1 em relação aos grupos G2 e G3, principalmente nos órgãos mais infectados por amastigotas de *L. infantum*, como o duodeno e o cólon. A intensidade parasitária por *L. infantum* no intestino grosso esteve correlacionada negativamente com as células T CD4⁺, e positivamente com os linfócitos T CD8⁺ e macrófagos. Em conclusão, os cães polissintomáticos para LVC do grupo G1 demonstraram alterações microscópicas na mucosa intestinal, marcada por processos inflamatórios associados com a proliferação de células mononucleares como macrófagos e linfócitos T CD8⁺. Já os cães polissintomáticos do grupo G2 apresentaram uma hiperplasia de células granulocíticas sugerindo uma possível infecção secundária por agentes não parasitários. Concluiu-se ainda que a doença LVC pelo seu caráter debilitante e imunossupressor pode comprometer a homeostasia intestinal, indireta ou diretamente pela presença de formas amastigotas de *L. infantum* correlacionadas com alguns sinais clínicos específicos da doença e com alterações patológicas na mucosa intestinal.

Palavras-chave: Cão. Células granulocíticas. Leishmaniose visceral. Monócitos. Trato intestinal.

ABSTRACT

The aim of this study was a descriptive evaluation on the profile of granulocytic and monocytes cells in the intestines of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* in the presence or absence of the parasite in the intestine. In addition, it was performed a correlation study among parasite intensity, clinical factors of the host, the cells and the histopathological changes of the intestinal wall. 39 dogs were evaluated, but only 20 were used in the studies, 17 positive for canine visceral leishmaniasis (CVL) and three negative. The animals with CVL were euthanized in the Zoonosis Control Center (CCZ) of Ilha Solteira, SP, Brazil, and the negative animals had natural death for several reasons. The histochemical and immunohistochemical techniques were used to stain the cells and *Leishmania* amastigotes, and to proceed the histopathological analysis of the intestinal tract. The dogs were divided into three groups (G1, G2 and G3). Eight dogs positive for CVL and with amastigotes of *L. infantum* in the gut was selected to G1 group; nine CVL positive dogs without intestinal amastigotes were in G2 group and three negative dogs in the control group (G3). All animals showed no gastrointestinal parasite co-infection by coproparasitological examinations in vivo or post-mortem. Clinical variables of the animals, the parasite intensity, the presence of monocytic cells (CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and macrophages) were evaluated by a semiquantitative analysis based on scores ranging from 1 to 4. However, granulocytic cells (neutrophils, eosinophils, and mast cells) was quantified in the mucosa (villus and crypt unit - UVC), submucosa and muscle. For comparison analysis between groups (G1, G2 and G3), the Kruskal-Wallis test was used to evaluate the clinical variables, the t test for granulocytic cells, and Duncan's test to compare the monocytic cells. Correlation analyzes were based on Spearman test (semiquantitative data) and linear correlation coefficient of Pearson (quantitative data). Amastigote forms of *L. infantum* were detected in 40% animals (8/20) and was distributed in the lamina propria of mucosa (villi and crypts), submucosal and muscular layers of the small intestine and in the mucosa and submucosa of the colon. The most prominent inflammatory reaction in group G1 was characterized by a chronic infiltration of mononuclear cells, mainly macrophages, lymphocytes and plasma cells. Dogs from G1 group were the most infected; however, there was not statistical difference from G2 group for all variables studied, particularly in the intestinal mucosa, but statistically differed in relation to the control group (G3). In the G1 group, there was a positive and significant correlation between parasite intensity, the microscopic structural changes in the mucosa, and systemic clinical signs. According to the analysis of granulocytic cells (neutrophils, eosinophils and mast cells), a significant increase in numbers of cells was observed ($p \leq 0.05$) in the G2 group, followed by the animals from G1, compared to control group (G3). There was not statistical difference ($p \leq 0.05$) in numbers of CD4⁺ T lymphocytes among groups G1, G2 or G3. However, there was significant increase ($p \leq 0.05$) of CD8⁺ T lymphocytes and macrophages in group G1 in relation to G2 and G3 groups, mainly in duodenum and colon, which were the most infected organs by *L. infantum*. The intensity of infection by *L. infantum* in the large intestine was negatively correlated with CD4⁺ T cells and positively with CD8⁺ T lymphocytes and macrophages. In conclusion, polysymptomatic dogs for CVL (G1) showed microscopic changes in the intestinal mucosa, marked by inflammation associated with the proliferation of mononuclear

cells such as macrophages and CD8⁺ T lymphocytes. The increase of granulocytic cells in dogs from G2 group, suggests a possible infection by other not parasitic agents present in the intestinal wall from these animals. Since the CVL is a debilitate and immunosuppressive disease it can change the intestinal homeostasy, indirect or directly by the presence of intestinal *L. infantum* amastigotes that was correlated with severe specific clinical signs of the disease and with intestinal mucosal pathological alterations.

Keywords: Dog. Granulocyte cells. Visceral leishmaniasis. Monocytes. Intestinal tract

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Resultado das análises coproparasitológicas, das cropoculturas e da observação do conteúdo intestinal dos cães. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015	74
Tabela 2 - Resultado dos cães avaliados quanto à positividade para LV e formação dos grupos, onde: G1: cães com LVC e com amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> no intestino; G2: cães positivos para LV e sem <i>L. infantum</i> no intestino; G3: cães negativos para LVC (controle). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015	75
Tabela 3 - Resultado da intensidade parasitária em tecidos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) positivos para amastigotas de <i>L. infantum</i> de cães com LVC, com carga parasitária variando de (+) a (+++). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015...	107
Tabela 4 - Comparação entre as variáveis clínicas, alterações macro e microscópicas da mucosa intestinal em cães do grupo G1 (cães positivos para LVC e com amastigotas de <i>L. infantum</i> no intestino), do grupo G2 (cães positivos para LV e sem amastigotas no intestino) e do grupo G3 (cães do grupo controle). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....	108
Tabela 5 - Correlação das variáveis clínica e parasitária dos cães com amastigotas de <i>L. infantum</i> no intestino (Grupo 1) por meio do coeficiente de correlação linear de Spearman ($P \leq 0,05$). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015	109
Tabela 6 - Número médio de neutrófilos no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon) de cães do grupo controle (G3) e de cães com leishmaniose visceral (LVC) em condições da presença de amastigotas de <i>L. infantum</i> no trato intestinal (G1) e na ausência do parasita no intestino (G2). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....	140
Tabela 7 - Número médio de eosinófilos no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon) de cães do grupo controle (G3) e de cães com leishmaniose visceral (LV), em condições da presença de amastigotas de <i>L. infantum</i> no trato intestinal (G1) e na ausência do parasita no intestino (G2). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....	141
Tabela 8 - Número médio de mastócitos (MC) no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon) de cães do grupo controle (G3) e de cães com leishmaniose visceral (LV), em condições da presença de amastigotas de <i>L. infantum</i> no trato intestinal (G1) e na ausência do	142

parasita no intestino (G2). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....

Tabela 9 -	Análise de correlação entre as células granulocíticas: neutrófilos (NEU), eosinófilos (EOS) e mastócitos (MAS) presente no intestino delgado (ID) e grosso (IG) de cães do grupo controle (G3) e de cães com leishmaniose visceral (LV), em condições da presença de amastigotas de <i>L. infantum</i> no trato intestinal (G1) e na ausência do parasita no intestino (G2). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....	143
Tabela 10 -	Resultado em escore e intensidade parasitária (+) da análise semiquantitativa da intensidade parasitária em tecidos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) avaliados na região da mucosa (unidade de vilo e cripta - UVC) de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> , com escore parasitário variando de 1 (+) a 4 (++++). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.	175
Tabela 11 -	Resultado da análise semiquantitativa dos linfócitos T CD4 ⁺ em tecidos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) avaliados na região da mucosa (unidade de vilo e cripta - UVC) de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> , com escore parasitário variando de 1 (+) a 4 (++++). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.	176
Tabela 12 -	Resultado da análise semiquantitativa dos linfócitos T CD8 ⁺ em tecidos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) avaliados na região da mucosa (unidade de vilo e cripta - UVC) de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> , com escore parasitário variando de 1 (+) a 4 (++++). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.	177
Tabela 13 -	Resultado da análise semiquantitativa dos macrófagos em tecidos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) avaliados na região da mucosa (unidade de vilo e cripta - UVC) de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> , com escore parasitário variando de 1 (+) a 4 (++++). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.	178
Tabela 14 -	Análise de correlação entre as células monocíticas (linfócitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e macrófagos) com a intensidade parasitária de amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> no intestino de cães naturalmente infectados do grupo G1 e, somente entre as células monocíticas para os cães do grupo G2. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.	179

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1- Cães sintomáticos e positivos para LVC. A: cão debilitado que recebeu tratamento com alopurinol e dexametasona para leishmaniose; B: lesão no membro torácico esquerdo (seta); C: onicogrifose acentuada (seta); D: cão em estado de caquexia, com alopecias e onicogrifose; E: secreção ocular (seta) e magreza; F: linfonodo poplíteo infartado no membro pelvico esquerdo (seta), Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....</p>	73
<p>Figura 2- Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC. A: (íleo) numerosos macrófagos repletos com as formas amastigotas de <i>L. infantum</i> na ponta do vilo (objetiva de 40x); B: maior aumento de A, em destaque na ponta das setas pretas as formas amastigotas (objetiva de 100x). C e D: (jejuno) formas amastigotas de <i>Leishmania</i> (pequenas setas pretas) observadas na camada de musculatura circular interna, como na longitudinal externa, e os parasitas também são vistos entre as fibras musculares ou no interior do plexo nervoso mioentérico (objetiva de 100x). E: (duodeno) parasitas (setas pretas) em placas de Peyer (nódulos linfáticos isolados) (objetiva de 40x); F: maior aumento de E, na ponta das setas pretas as amastigotas nas placas de Peyer (objetiva de 100x). V= vilo; CM= musculatura circular interna; LM= musculatura longitudinal externa; MP= plexo nervoso mioentérico; M=mucosa; PP=placas de Peyer. Coloração = Imunoistoquímica. Barras = 50 µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.</p>	110
<p>Figura 3- Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC. A: (duodeno) observe na camada epitelial da ponta do vilo, um infiltrado mononuclear, semelhante à histiolinfoplasmocitário (seta amarela), caracterizando uma enterite, com moderados microvacúolos e edema apical, semelhante a um pólipio linfangiomatoso (ponta de seta vermelha). Não se observa células cilíndricas altas e o eixo conjuntivo vascular está tomado por infiltrado celular linfocitário (ponta de seta preta) (objetiva 20x). B: (duodeno) desnudamento do epitélio (ponta da seta azul). C: (íleo) ponta do vilo com muitos macrófagos (retângulo preto) infectados com amastigotas <i>L. infantum</i> (objetiva 40x). D: maior aumento de C (objetiva 100x), com macrófagos infectados (setas brancas) e linfócitos (setas pretas). Nota-se dilatação dos vasos linfáticos dilatados na ponta da vilosidade. V=vilo; L=vasos linfáticos. Coloração: H&E. Barras = 50 µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015... ..</p>	111
<p>Figura 4- Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC. A:</p>	

	cripta basal do cólon (objetiva 40x) parasitado. B: maior aumento de A (objetiva 100x) em detalhes do quadrado preto, com inúmeras amastigotas dentro e fora de macrófagos hipertrofiados (pequenas setas pretas) e uma cripta atrófica ao centro. C: interrupção da <i>Muscularis</i> mucosa (barra preta), com infiltrado de células inflamatórias na submucosa e na mucosa (retângulo preto) (objetiva 20x). D: maior aumento de C (objetiva 100x): com amastigotas livres (pequenas setas pretas), macrófagos com parasitas (setas brancas), e plasmócitos (ponta de seta preta) e células gigantes (seta vermelha). E: reação inflamatória crônica granulomatosa na submucosa (quadrado preto) (objetiva 20x). F: maior aumento de E (objetiva 100x) com muitos macrófagos infectados (pequenas setas pretas), linfócitos e células plasmáticas. M=mucosa; SM=submucosa; VCU=unidade de vilo e cripta; C=cripta; MM= <i>Muscularis</i> mucosa. Coloração = H&E. Barras = 50 µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.	112
Figura 5-	Alterações microscópicas (diarreia, reação HLP = reação histiolinfoplasmocitária, PMN=polimorfonucleares, congestão e hemorragia) consideradas relevantes no estudo de descrição histopatológica da mucosa intestinal de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> . Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....	113
Figura 6-	Análise de correlação observada entre a intensidade parasitária (SIP), a variável que representa as alterações microscópicas (SAMI) na mucosa intestinal, e os sinais clínicos gerais (SSC) de cães positivos com LVC e com amastigotas de <i>L. infantum</i> no intestino. A: média geral de todas as porções do intestino, B: duodeno (D), C: Jejun (J), D: Íleo (I), E: Cólon (C). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....	114
Figura 7-	Número médio de neutrófilos na mucosa intestinal do duodeno, jejuno, íleo e cólon dividido pelas regiões de vilosidade e criptas (VCU), submucosa (SM) e muscular (Mu) dos animais do grupo controle (G3) e dos animais com LVC, na condição da ausência do parasito no intestino (G2) e presença de amastigotas de <i>L. infantum</i> no intestino (G1). O desvio padrão da média esta representado pelas barras verticais acima das colunas. As letras indicam comparação de médias entre os grupos (G1, G2, G3) dentro de cada segmento intestinal, ($p \leq 0,05$). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....	144
Figura 8-	Número médio de eosinófilos na mucosa intestinal do duodeno, jejuno, íleo e cólon dividido pelas regiões de vilosidade e criptas (VCU), submucosa (SM) e muscular (Mu) dos animais do grupo controle (G3) e dos animais com LVC, na condição da ausência do parasito no intestino (G2) e presença de amastigotas de <i>L.</i>	145

infantum no intestino (G1). O desvio padrão da média esta representado pelas barras verticais acima das colunas. As letras indicam comparação de médias entre os grupos (G1, G2, G3) dentro de cada segmento intestinal, ($p \leq 0,05$). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....

- Figura 9- Número médio de mastócitos na mucosa intestinal do duodeno, jejuno, íleo e cólon dividido pelas regiões de vilosidade e criptas (VCU), submucosa (SM) e muscular (Mu) dos animais do grupo controle (G3) e dos animais com LVC, na condição da ausência do parasito no intestino (G2) e presença de amastigotas de *L. infantum* no intestino (G1). O desvio padrão da média esta representado pelas barras verticais acima das colunas. As letras indicam comparação de médias entre os grupos (G1, G2, G3) dentro de cada segmento intestinal, ($p \leq 0,05$). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015..... 146
- Figura 10- Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC, com ausência de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino. A: (cólon) na ponta das setas amarelas neutrófilos no interior de vasos presente na submucosa e entre as vilosidades, (objetiva 20x). B: (cólon) neutrófilos na ponta da seta amarela e dentro do circulo próximo a cripta (objetiva 40x). C: (duodeno), presença de eosinófilos na ponta dos vilos (ponta das setas brancas), (objetiva 40x); D: (duodeno), eosinófilos na base da cripta (ponta das setas brancas), (objetiva 100x). VCU = unidade de vilo/cripta; SM = submucosa; C = cripta; V =vilos. Coloração (A e B) = hematoxilina e eosina (HE); (C e D) = Azul de Astra e Direct red 75. Barras = 50 μ m. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015 147
- Figura 11- Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC. A e B: em cães com ausência de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino (grupo G2); C e D: em cães com presença de amastigotas intestinais (grupo G1). A: (duodeno) mastócitos na ponta das setas pretas por toda a extensão do vilo. B: (cólon) mastócitos na ponta das setas pretas na base da cripta. C: (jejuno), presença de mastócitos na submucosa e associada ao plexo nervoso mioentérico. D: (jejuno) presença de mastócitos nas camadas de musculo liso tanto circular interno (CM), como longitudinal externo (LM). V = vilos; C = cripta; SM = submucosa; MP = plexo nervoso mioentérico; CM = túnica muscular circular interna; LM = túnica muscular longitudinal externa. Coloração = Azul de Astra e Direct red 75. Barras = 50 μ m, objetiva (40x). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015. 148
- Figura 12- Fotos de secções histológicas do intestino delgado (A, B, C e D) e do intestino grosso (E e F) de cães com LVC e com amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino, pertencentes 180

ao grupo experimental G1. Fotos A, C e E: imunomarcadas para linfócitos T CD4⁺. Fotos B, D e F: imunomarcadas para linfócitos T CD8⁺. A e B: vilo da região do duodeno (animal 04). C e D: cripta basal do duodeno (animal 04). E e F: cripta basal do cólon (animal 05). Coloração = Imunoistoquímica. Objetiva = 40x. Barras = 50µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.....

- Figura 13- Fotos de secções histológicas do intestino delgado (A, B, C e D) e do intestino grosso (E e F) de cães com LVC e sem amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino, pertencentes ao grupo experimental G2. Fotos A, C e E: imunomarcadas para linfócitos T CD4⁺. Fotos B, D e F: imunomarcadas para linfócitos T CD8⁺. A e B: vilo da região do duodeno (animal 01), objetiva 40x. C e D: cripta basal e placa de Peyer do íleo (animal 03), objetiva 20x. E e F: vilosidades do cólon (animal 05), objetiva 40x. Coloração = Imunoistoquímica-peroxidase. Barras = 50µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015 181
- Figura 14- Fotos de secções histológicas do intestino delgado (A, B) e do intestino grosso (C e D) de cães com LVC e com amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino, pertencentes ao grupo experimental G1. A: base da cripta e submucosa do íleo com aglomerado de células inflamatórias imunomarcada para linfócitos T CD4⁺ (animal 05). B: mesma região da foto A, porém imunomarcada para linfócitos T CD8⁺. C: placa de Peyer presente no cólon imunomarcada para linfócitos T CD4⁺ (animal 04). D: mesma região da foto C, porém imunomarcada para linfócitos T CD8⁺. Coloração = Imunoistoquímica-peroxidase. Objetiva = 40x. Barras = 50µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015 182
- Figura 15- Escore médio obtido do estudo semiquantitativo de linfócitos T (CD4⁺) na mucosa intestinal (UVC) do duodeno, jejuno, íleo e cólon de cães com leishmaniose visceral canina (LVC) e com a presença de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino (G1), na ausência do parasita (G2) e, cães controle sem a doença (G3). A análise estatística na comparação de médias foi realizada de acordo com o teste de Duncan. Proporções com letras idênticas (a) não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015 183
- Figura 16- Escore médio obtido do estudo semiquantitativo de linfócitos T (CD8⁺) na mucosa intestinal (UVC) do duodeno, jejuno, íleo e cólon de cães com leishmaniose visceral canina (LVC) e com a presença de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino (G1), na ausência do parasita (G2) e, cães controle sem a doença (G3). A análise estatística na comparação de médias foi realizada de acordo com o teste de Duncan. Proporções com letras idênticas (a) não são significativamente diferentes ao 184

nível de 5% de probabilidade. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015

Figura 17- Escore médio obtido do estudo semiquantitativo de macrófagos (MAC) na mucosa intestinal do duodeno, jejuno, íleo e cólon de cães com leishmaniose visceral canina (LVC) e com a presença de amastigotas de *L. infantum* no intestino (G1), na ausência do parasita (G2) e, cães sem a doença (G3). A comparação de médias foi realizada de acordo com o teste de Duncan. Proporções com letras diferentes (a/b/c) são estatisticamente significantes a nível de 5% de probabilidade. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015 185

Figura 18- Fotos de secções histológicas do intestino grosso de cães com LVC em presença e/ou ausência de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino, pertencentes aos grupos experimentais G1 e G2. Fotos A, C e E: microscopia do cólon de animais pertencentes ao grupo G2. Fotos B, D e F: microscopia do cólon de animais pertencentes ao grupo G1. A e B: entre as criptas do cólon. C e D: cripta basal e submucosa. E e F: submucosa. Setas vermelhas = macrófagos normais. Setas amarelas = macrófagos hipertróficos com amastigotas. Coloração = histoquímica por H&E. Objetiva = 100x. Barras = 50µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015..... 186

CAPÍTULO 01 – Considerações Gerais

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) em humanos ocorre em cerca de 70 países, com alta incidência chegando a ocasionar 59 mil óbitos anuais. No Brasil, é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*), e é transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. O panorama epidemiológico no Brasil demonstra a franca expansão geográfica da LV. No período de 1980 a 2008, foram notificados mais de 70 mil casos de LV no país, levando mais de 3.800 pessoas à morte. O número médio de casos registrados anualmente cresceu de 1.601 (1985-1989), para 3.630 (2000-2004), estabilizando-se a partir de então. Na década de 1990, apenas 10% dos casos ocorriam fora da região nordeste mas, em 2007, este número chegou a 50% dos casos (WERNECK, 2010).

O cão é considerado o reservatório de maior importância da leishmaniose visceral canina (LVC) quando se considera a forma zoonótica da doença, pois é responsável pela manutenção do parasita em focos endêmicos, devido especialmente, a alta prevalência da doença nesses animais, presença de formas amastigotas na pele e pela proximidade com o homem (ALVAR et al., 2004).

Em animais suscetíveis, após a inoculação, já nas primeiras horas pode ocorrer a disseminação do parasito por via hemática ou linfática, iniciando pela pele, linfonodos, baço, medula óssea, fígado, rins e os órgãos reprodutivos. Com a evolução da doença, os parasitos podem alcançar a vesícula urinária, sistema respiratório e digestório (CARDOSO; CABRAL, 1999; ALVAR et al., 2004).

A presença do parasito e outros agentes patogênicos associados nos órgãos e tecidos, determinam reações que produzem as lesões e os sinais clínicos da LVC (REIS et al., 2006).

Portanto, a presença do parasito *L. infantum* pode ser observada simultaneamente em uma ampla variedade de órgãos sistêmicos dos cães, comprovando assim a íntima relação do hospedeiro cão com o parasito. O acometimento também do trato intestinal de cães com LVC está associado com a evolução da doença e pode geralmente caracterizar a doença no seu estágio final.

No entanto, ainda pouco se conhece sobre a interação do parasito com esses órgãos.

Dessa forma, essa pesquisa visou realizar um estudo sobre o perfil das células monocíticas e granulocíticas na parede intestinal de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, caracterizados de acordo com a presença ou ausência do parasita no intestino. Além disso, realizou-se um estudo de correlação entre a intensidade parasitária, os fatores clínicos do hospedeiro, as células estudadas e as alterações estruturais microscópicas e macroscópicas intestinais. As alterações histopatológicas da parede intestinal relacionadas com a presença das formas amastigotas de *L. infantum* também foram avaliadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose visceral canina: aspectos gerais

A LVC é uma enfermidade parasitária crônica, causada por protozoários pertencentes ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), que infectam macrófagos de uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem e o cão (DE LUCA et al., 1999; NIETO et al., 1999). Dentro do gênero *Leishmania* existem cerca de 30 espécies, das quais aproximadamente 21 são patogênicas para a espécie humana (HERWALDT, 1999; ASHFORD, 2000).

A LV é uma doença que tem como agente etiológico as espécies *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* encontrada na Índia, Bangladesh e Nepal, *Leishmania* (*L.*) *infantum* de manifestação na bacia do Mediterrâneo, o chamado “Velho Mundo”, Europa, África e China, e a *Leishmania* (*L.*) *chagasi* encontrada nas Américas do Norte, Central e do Sul, o “Novo Mundo” (LAISON; SHAW, 1987; WHO, 2002). A constituição morfológica das espécies *L. (L.) chagasi* e *L.(L.) infantum*, são muito semelhantes, onde alguns autores compararam suas estruturas em estudos bioquímicos e moleculares e sugeriram que as espécies podem ser consideradas como uma única espécie formando um grupo monofilético dentro do complexo *Donovani*, permitindo assim que denominem de *L. (L.) infantum* o agente etiológico

desta zoonose também nas Américas (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 1999; MAURÍCIO et al., 2000; KUHLS et al., 2011).

O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (ALENCAR; DIETZA, 1991). A partir de um estudo realizado para diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, encontraram-se 41 casos positivos para *Leishmania*, sendo identificados em lâminas de viscerotomias praticadas “post-mortem”, em indivíduos oriundos das regiões Norte e nordeste (PENNA et al., 1934).

Nas duas últimas décadas, a LV reapareceu no mundo de forma preocupante. Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil (BRASIL, 2006a). A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais, periurbanas e, mais recentemente, em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. No Brasil a LV já foi registrada em 21 das 27 unidades da federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone, sendo que, em todos eles, tem sido relatada a associação entre a existência de cães infectados e a presença do vetor (MILES et al., 1999; LAINSON; RANGEL, 2005; BRASIL, 2006b).

No ambiente urbano, o cão é considerado o principal reservatório de parasitos de *Leishmania* spp. pelos registros de casos caninos serem maiores do que os casos humanos e pelo maior número de parasitas encontrados na pele dos cães do que em humanos, sendo assim considerados importantes na epidemiologia da doença (DEANE; DEANE, 1955). Cães com menos de três anos de idade ou mais do que sete anos apresentam maior risco para LVC, sendo o primeiro grupo mais susceptível que o segundo (MORENO; ALVAR, 2002) e, cães com pelame curto parecem apresentar maior risco de adquirir a doença (FRANÇA-SILVA et al., 2003; MOREIRA- JÚNIOR et al., 2003).

Em relação aos fatores associados ao ambiente e ao hábito do animal, os cães residentes em áreas rurais, animais que vivem fora da residência, com acesso à mata, córregos e pastagens, que permanecem soltos e aqueles que não possuem

abrigo apresentam maiores chances de serem infectados para LVC (SILVA, et al., 2013).

A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é pela picada da fêmea infectada de insetos hematófagos da ordem *Diptera*; família *Psychodidae*; subfamília *Phlebotominae*, conhecidos popularmente como mosquitos palha, Birigui ou tatuquiras, e que consistem de várias espécies do gênero *Lutzomyia*, dentre as quais o *L. longipalpis*, de tamanho bastante reduzido, com cerca de 2 a 3 mm de comprimento (DEANE; DEANE, 1955; ALENCAR et al., 1991; CASTRO, 1996; RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Os insetos dessa família têm como características a coloração amarelada ou cor de palha. Em posição de repouso, suas asas permanecem eretas e semiabertas. A atividade desses vetores é crepuscular e noturna, sendo que, no intra e no peridomicílio, o *L. longipalpis* é encontrado principalmente próximo a uma fonte de alimento (BRASIL, 2006a) As fêmeas realizam o repasto sanguíneo no período noturno, iniciando-o cerca de uma hora após o crepúsculo (CASTRO, 1996) e seu ciclo larval na matéria orgânica úmida e de baixa incidência luminosa, fato que dificulta o combate desses vetores (SANTA ROSA; OLIVIERA, 1997).

O ciclo biológico da espécie *L. longipalpis* ocorre em aproximadamente 28 a 36 dias. As fêmeas realizam a ovoposição em locais sombreados, úmidos e ricos em matéria orgânica. Os adultos, machos e fêmeas necessitam de carboidrato como fonte de energia, mas, somente as fêmeas são hematófagas, pois precisam ingerir sangue para a manutenção dos ovos (SOARES; TURCO, 2003).

O mosquito palha, ao repousar sobre o hospedeiro vertebrado infectado, pica-o através da pele e ingere com o sangue as formas amastigotas que, no intestino médio, sofrem divisão binária, modificam-se em promastigotas e migram para o intestino anterior. Na parede do intestino anterior, fixadas pelo flagelo sofrem multiplicação e diferenciação, transformando-se em promastigotas metacíclicas infectantes que são inoculadas na pele de outro hospedeiro pela probóside do mosquito durante o repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK, 2002).

Na epiderme do hospedeiro, durante a hematofagia realizada pelo inseto infectado, ocorre a inoculação da saliva que pode modular a resposta imune local e também das formas promastigotas na pele do hospedeiro. Uma vez introduzidas, as

formas promastigotas são fagocitadas inicialmente por neutrófilos que são capazes de eliminar o parasita por uma série de mecanismos leishmanicidas. Contudo, uma pequena população parasitária pode sobreviver em seu interior e levar a perpetuação do parasita por uma importante via de escape da resposta imune inata. (PEARSON; STEIGBIGEL, 1981; LASKAY et al., 2003). Quando as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos, elas se diferenciam rapidamente em formas amastigotas, com formato arredondado e sem flagelo. Estes parasitos multiplicam-se até que ocorra o rompimento dos macrófagos e neutrófilos inicialmente infectados, e então, as formas amastigotas liberadas infectam novos macrófagos, resultando no desenvolvimento da doença (OLIVEIRA, 2003).

As estratégias de controle, no Brasil, estão sendo baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos vetores por meio do uso de inseticidas e na triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose (COSTA; VIEIRA, 2001; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

As manifestações clínicas da doença, no cão e no homem são similares, mas apresentam sinais inespecíficos, como febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso e caquexia em seu estágio final (LONGSTAFF et al., 1983; MARZOCHI et al., 1985; RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). São necessários meses ou até mesmo anos para que os cães infectados desenvolvam sinais clínicos, de tal modo que a doença pode tornar-se aparente bem depois dos cães terem saídos de áreas endêmicas. Na forma visceral, que é mais comum, os cães desenvolvem febre intermitente, anemia, opacidade do pelame, perda de peso, onicogrifose, edema de membros, linfadenopatia generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, alterações cutâneas e ceratoconjuntivite (URQUHART et al., 1996).

Dependendo da imunocompetência do hospedeiro, os sinais clínicos tornam-se evidentes dentro de um período que varia de um mês a vários anos, mas, uma vez iniciado o processo, a doença evolui inevitavelmente para a morte (SLAPPENDEL; GREENE, 1990; GENARO, 1993).

2.2 Alterações no intestino

A primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e antigênicos exógenos presentes no trato gastrointestinal, inclui a barreira física fornecida por células epiteliais (enterócitos), as junções apertadas formadas entre eles, os movimentos ciliares, a secreção de muco pelas células caliciformes, a atividade citotóxica das células natural *killer*, assim como a produção de peptídeos antibacterianos por células de Paneth que incluem defensinas, lisozima e fosfolipase A2 secretória (MENDLOVIC; FLISSER, 2010).

Com a infecção parasitária no organismo as respostas imunológicas são as primeiras a se expressarem e, em diferentes regiões do organismo atuam no combate aos antígenos. De acordo com Fuzissaki (2009), milhões de anos de evolução serviram para que animais vertebrados desenvolvessem elaborados sistemas de defesa contra a presença de patógenos para os fagócitos como, neutrófilos, eosinófilos e monócitos desempenharem um papel essencial para a sobrevivência do organismo.

Como a leishmaniose é uma doença de caráter crônico, espera-se que a parede intestinal de animais infectados apresente-se espessada, particularmente a musculatura lisa intestinal e possivelmente ocorra também alguma alteração ao nível do sistema nervoso entérico. Este fato já foi observado em infecções causadas por helmintos parasitas intestinais observando-se uma interação entre mastócitos e nervos numa regulação da fisiologia intestinal em resposta aos antígenos dos parasitas (MCKAY; BIENENSTOCK, 1994).

Lesões inflamatórias no trato gastrointestinal associadas com a presença de amastigotas no interior de macrófagos já foram relatadas em cães infectados experimentalmente com amastigotas de *Leishmania* spp. (KEENAN et al., 1984a; KEENAN et al., 1984b; CHIAPELLA, et al., 1986). Em trabalho experimental com hamsters, Gonzáles et al. (1986) identificaram a ocorrência de amilóides na lâmina própria e na submucosa intestinal como resultado da disfunção patológica devido à LV. Havia infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. No estágio final da infecção foi observada degeneração das células epiteliais e moderada hiperplasia de nódulos linfáticos. Em um trabalho desenvolvido com cães da raça

Beagle por Gonzáles et al. (1990), ficou demonstrado, pelo exame histológico, uma infiltração inflamatória difusa da mucosa e da submucosa intestinal por macrófagos contendo amastigotas, linfócitos, neutrófilos e alguns eosinófilos. A degeneração superficial do epitélio causou o desenvolvimento de erosões da mucosa e diminuição no número de criptas de Lieberkühn.

Mais recentemente, Silva et al. (2011) constataram formas amastigotas de *Leishmania* sp. no intestino de cães naturalmente infectados. Os parasitas estavam localizados no intestino delgado e grosso em todas as camadas intestinais, como a mucosa, submucosa e a muscular. A presença dos parasitas no intestino desses animais sugere a importância dessa doença afetando também o trato intestinal de cães naturalmente infectados com LV e que necessita de novas investigações.

2.3 Neutrófilos

Os neutrófilos são as primeiras células no mecanismo de defesa a chegar ao processo inflamatório e desempenham funções importantes na resposta imune inata e adaptativa. São provenientes de precursores da linhagem mielóide e caracterizam-se por apresentar um núcleo multilobulado e citoplasma contendo grânulos finos (LORENZI, 2005).

Ao detectar a presença de agentes patogênicos no tecido do hospedeiro, o epitélio é ativado e assim, mastócitos e macrófagos teciduais residentes liberam quimiocinas como a interleucina-8, IFN- γ e C5a que atraem neutrófilos. Depois da diapedese através da parede endotelial dos capilares sanguíneos, os neutrófilos migram para o local da infecção e combatem patógenos intrusos. Fagocitados, esses agentes patogênicos são mortos por péptidos, como catelicidinas e defensinas, bem como por proteases agressivas (elastase de neutrófilos, catepsina G, proteinase 3), ou por espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante a explosão oxidativa (TACCHINI-COTTIER; ZANDBERGEN, 2011).

A inoculação de promastigotas de *Leishmania* spp. na derme de mamíferos pela picada do mosquito vetor pode ser acompanhada por um rápido recrutamento de neutrófilos, monócitos e células dendríticas. No entanto, apesar da presença desses leucócitos líticos, os parasitas sobrevivem. Em um estudo *in vivo*, utilizando

hamsters infectados com *L. chagasi* e camundongos infectados com *L. amazonensis*, Laurenti (2010) observou que os neutrófilos eram as primeiras células a migrarem para o ponto de inoculação dos protozoários formando um afluxo intenso dessas células. Esses neutrófilos apresentavam leishmanias com aspecto de degeneração celular no interior do seu citoplasma após a fagocitose. Esses dados reforçaram o importante papel dos neutrófilos na lise de parasitos contribuindo para o controle da infecção.

No entanto, outros estudos mostraram que promastigotas de *Leishmania major* invadiam eficientemente os neutrófilos que eram recrutados para o local da picada do vetor e que os parasitas permaneciam viáveis dentro dessas células. Essa condição levou alguns estudiosos a postular uma nova teoria para o papel dos neutrófilos na interação com parasitos do gênero *Leishmania*, chamada de “Cavalo de Tróia” (VAN ZANDBERRGEN et al., 2004). Desta maneira, os neutrófilos atuariam como células hospedeiras temporárias de *Leishmania* spp. pois facilitariam uma entrada silenciosa dos parasitas nos macrófagos, que facilmente fagocitariam os neutrófilos apoptóticos infectados, sem ativar mecanismos microbicidas nestas células (ROGERS et al., 2009).

Guelrard et al. (2008) mostraram que a superfície de *L. donovani* composta por lipofosfoglicana (LPG) não só evitava a sua fusão ao lisossomo da célula neutrófilo para ser destruída mas, pelo contrário, permitia a sua entrada em um outro compartimento que apresentava características de RE (retículo endoplasmático) para sobreviver. Se o neutrófilo, assim parasitado, entrasse em apoptose, este poderia ser fagocitado por macrófagos, o que permitiria a entrada dos parasitas para a célula hospedeira final e assim replicar. Dessa maneira, a habilidade que *L. donovani* tem de driblar a sua entrada nos compartimentos lisossomais, é a chave do sucesso da sobrevivência da espécie e de seu estabelecimento permanente nos macrófagos.

Contudo, o sucesso das leishmanias no interior dos macrófagos, independe da forma de entrada do parasito nesse tipo celular, pois a via de escape apresentada por neutrófilos, apenas garante que o parasita chegue à sua célula hospedeira definitiva. Após adentrar nos macrófagos, novos desafios devem ser vencidos para que a infecção se estabeleça com sucesso (LAURENTI, 2010).

2.4 Macrófagos

Protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* exibem um pronunciado tropismo por macrófagos, embora eles tenham a capacidade de infectar outras células fagocíticas ou não fagocíticas de mamíferos. Ao contrário da maioria dos patógenos intramacrofágicos, o estágio mais proliferativo de *Leishmania* reside em fagolisossomos maduros dessas células hospedeiras (NADERER; MCCONVILLE, 2008).

As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos, diretamente ou indiretamente com ajuda dos neutrófilos, inicialmente recrutados pela picada do mosquito vetor (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). As promastigotas são introduzidas nos compartimentos vacuolares com características de fagolisossomos dos macrófagos onde se diferenciam para o estágio amastigota. As amastigotas proliferam por divisão binária e podem se espalhar para outros macrófagos ou outras células fagocíticas (células dendríticas) e não fagocíticas (fibroblastos) (NADERER; MCCONVILLE, 2008).

As formas amastigotas de *Leishmania* spp. apresentam em sua superfície uma camada espessa de glicocálice composto por glicosilfosfatidilinositol (GPI), proteínas, o fosfoglicano GPI-proteínas, o LPG e uma família de glicolípídeos livres, denominado de glicoinositolfosfolipídio (GIPLs). Esse glicocálice pode facilitar a fagocitose de células apoptóticas pelo macrófago via receptores (NADERER et al., 2004).

Dessa forma, o parasita se liga a diferentes receptores encontrados na superfície dos macrófagos, tais como: receptor para a porção Fc das imunoglobulinas, receptores para frações do complemento CR1 e CR3 (CD11b/CD18 ou Mac-1), receptor para fibronectina e receptor para manose e fucose. Dentre as diferentes moléculas da membrana dos parasitos envolvidas nesta interação encontram-se glicoconjugados tais como glicoproteínas, glicolípídeos, e, entre eles, uma glicoproteína (gp63) de peso molecular de 63 kD (gp63) e o LPG. Esta ligação ocorre principalmente no receptor CR3 do macrófago, mesmo na

ausência de opsoninas do soro. Além da ligação ao CR3, a gp63 pode se ligar à célula hospedeira por meio do receptor para manose e fucose (LAURENTI, 2010).

No entanto, os macrófagos desempenham um papel importante no controle da infecção por *Leishmania* spp. e é um fato estabelecido que estas células podem participar da morte do parasita por mecanismos dependentes dos radicais livres oriundos da reação de oxigênio e do nitrogênio na explosão respiratória (RODRIGUES et al., 2007). Quando as formas promastigotas metacíclicas se ligam à superfície dos macrófagos, é desencadeado um fenômeno oxidativo celular, gerando metabólitos tóxicos de oxigênio, superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e, especialmente, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que tem sido responsabilizado pela principal atividade leishmanicida do macrófago (MURRAY, 1981; PEARSON et al., 1982). Além da resposta oxidativa, o macrófago possui outros mecanismos microbicidas, como é o caso do óxido nítrico (NO), gerado a partir da reação do aminoácido L-arginina com o oxigênio molecular (O_2) (LIEW et al., 1990).

No entanto, é importante ressaltar que a sobrevivência dos parasitos na célula hospedeira depende da sua capacidade de evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado, e um desses mecanismos refere-se às atividades microbicidas dos macrófagos (LAURENTI, 2010). Além disso, a dinâmica da *Leishmania* com os macrófagos envolve interação ligante-receptor entre as moléculas de superfície de ambos, seguida por uma série de reações bioquímicas que pode levar a ativação ou à inibição das funções microbicidas da célula hospedeira (RITTING; BOGDAN, 2000).

Por outro lado, as formas amastigotas de *Leishmania* diferem de outros patógenos por terem uma necessidade nutricional mais complexa e necessitarem retirar os nutrientes das células do hospedeiro. A disponibilidade dos nutrientes para as amastigotas intracelulares pode ser regulada pela ativação dos macrófagos e esse equilíbrio nutricional pode ser determinante para o restabelecimento do hospedeiro ou da manifestação da doença (NADERER; MCCONVILLE, 2008). Dessa forma, *Leishmania* e/ou a resposta imune do hospedeiro podem alterar o metabolismo normal da célula hospedeira e determinar a infecção. No entanto, é necessário avaliar os processos metabólicos do parasita e da célula no sentido de delinear esta interação dinâmica.

2.5 Células dendríticas

Na década de 70, Steinman e Cohn descreveram as células dendríticas (CDs), que se configuraram como células apresentadoras de antígenos (APC) e como tal, exercem um papel central na determinação da resposta imune (CLAUSEN; KEL, 2010). Este tipo celular deriva da medula óssea e interagem com células T e órgãos linfóides secundários como os linfonodos e o baço.

CDs são células chaves para o desenvolvimento da imunidade contra parasitas. Elas controlam as respostas necessárias para eliminá-los enquanto mantêm a homeostasia do hospedeiro. Entretanto, há evidências mostrando que os parasitas podem influenciar e regular as funções das CDs para promover um ambiente mais permissivo à sobrevivência deles (TERRAZAS; TERRAZAS; GÓMEZ-GARCIA, 2010).

As CDs são capazes de distinguir diferentes agentes patogênicos, o que lhes permite fornecer sinais para as células T para assegurar que uma resposta imunitária adequada seja iniciada. O reconhecimento de que existem diferentes tipos de CDs (por exemplo, mielóide e linfóide) pode, em parte, explicar efeitos pleiotrópicos e as tentativas de atribuir funções específicas para diferentes subgrupos de CDs. A ativação e a maturação dessas células acontecem através de receptores do tipo Toll (TLR), com a concomitante produção de IL-12 e outras citocinas. Com o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras e a capacidade de respostas à quimiocinas, as CDs conseguem migrar dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides. As CDs que recebem instruções no início de uma resposta imune pode ser o componente crítico para moldar os eventos subsequentes (SCOTT; HUNTER, 2002).

A resistência do hospedeiro ao parasito *Leishmania* spp. depende do desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 e da produção de citocinas IL-12 (REINER; LOCKSLEY, 1995), e, nesse ponto, as CDs desempenham um papel crítico (SUZUE, et al., 2008). Durante a infecção por *Leishmania*, as CDs ativadas pelas formas amastigotas ou promastigotas secretam IL-12 e TNF- α contribuindo para a resistência do hospedeiro (QI; POPOV; SOONG, 2001).

Entretanto, o efeito da infecção com *Leishmania* sobre CDs, como a maturação e a produção de citocinas varia muito de acordo com as espécies de *Leishmania*, provocando a sua maturação e produção de IL-12 (VON STEBUT et al., 1998; KONECNY et al., 1999) ou interferindo na sua diferenciação e habilidade de atuar como célula APC (FAVALI et al., 2007). Em um experimento *in vitro* com CDs, Qi; Popov; Soong (2001) demonstraram que amastigotas de *L. amazonensis* eram capazes de infectar e ativar essas células (CD11c⁺) resultando na produção de IL-4 e uma falha na produção de IL-12, desencadeando uma resposta imune T CD4⁺ Th2. As CDs infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* mostraram-se imaturas e menos potentes na apresentação de antígenos do que as infectadas com promastigotas, reduzindo sua capacidade de ativação das células T CD4⁺, o que sugere que a *L. (L.) amazonensis*, especialmente na sua forma intracelular, estava envolvida em uma estratégia única de suprimir eventos iniciais da imunidade inata, resultando no comprometimento das funções das CDs e da ativação da resposta Th1 (XIN; LI; SOONG, 2008).

Entretanto, a interação de *Leishmania* sp. com receptores TLRs e provavelmente outros receptores para induzir a ativação de CDs ainda não está clara. Dessa forma, estudos mais avançados devem ser conduzidos para o conhecimento das estratégias de *Leishmania* e sua sobrevivência na célula hospedeira.

2.6 Eosinófilos

Os eosinófilos são células polimorfonucleares granulocíticas que se originam da medula óssea. Este tipo celular é abundante nos infiltrados inflamatórios de hipersensibilidade a reações da fase tardia ou imediata que contribui para muitos dos processos patológicos das doenças alérgicas. São importantes células na defesa contra parasitas extracelulares, incluindo helmintos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Ao infectar subcutâneamente ratos albinos consanguíneos com amastigotas de *Leishmania mexicana mexicana*, Grimaldi; Soares; Moriearty (1984) observaram que os animais desenvolviam nódulos persistentes ou lesões de tamanho variável

correlacionadas com a capacidade do hospedeiro em controlar o parasita no tecido. Durante a fase aguda da doença, os resultados histopatológicos revelaram acúmulos de granulócitos, alguns fagócitos mononucleares e uma predominância de eosinófilos em comparação com outros tipos de células. No início desta fase aguda, os eosinófilos foram encontrados no tecido, juntamente com os mastócitos normais ou degranulados. Na reação inflamatória granulomatosa na fase crônica, houve infiltração de granulócitos próximos aos parasitas além da presença de macrófagos vacuolizados parasitados. O número de eosinófilos era consistentemente superior ao de neutrófilos, independentemente do tipo de lesão ou do número de parasitas presentes no tecido. Durante a reação aguda, os granulócitos aparentemente pareciam ter destruído muitos parasitas, no entanto, na fase crônica havia um número baixo de eosinófilos e neutrófilos em processo de fagocitose de amastigotas. Neutrófilos pareciam ser mais eficazes do que eosinófilos na destruição de parasitas fagocitados. A estreita associação entre eosinófilos e macrófagos parasitados foi visto nas lesões crônicas, assim, os eosinófilos podiam contribuir para a destruição do parasita através da cooperação com os macrófagos.

O intestino é muito especial no que diz respeito aos eosinófilos. Em todos os níveis, a mucosa normalmente contém eosinófilos (TALLEY, et al., 1992). De fato, a presença de eosinófilos constitutivos no intestino é provavelmente muito importante na defesa do hospedeiro e da fisiopatologia de doenças, porque eles liberam proteínas pró-inflamatórias granulares e prejudiciais aos parasitas (LEVY; KITA, 1996). Nesta região, os eosinófilos, ao se infiltrarem nos tecidos provavelmente podem secretar diversos fatores de crescimento ou citocinas como IL-3, IL-4, IL-8, TGF- α , TGF- β , GM-CSF, e IL-5 por um mecanismo autócrino e, assim, manterem-se no local do processo inflamatório (DESREUMAUX et al., 1992; MOQBEL; LEVI-SCHAFFER; KABY, 1994). No entanto, existem poucos relatos de produção de citocinas por eosinófilos na inflamação intestinal aguda ou crônica (LEVY; KITA, 1996).

2.7 Mastócitos

O mastócito (MC) maduro é uma célula globosa, grande e com citoplasma repleto de grânulos acidófilos que se coram intensamente. O núcleo é pequeno, esférico, central e de difícil observação por estar frequentemente encoberto pelos grânulos citoplasmáticos. Os mastócitos se originam de células precursoras hematopoéticas (produtoras de sangue) situadas na medula óssea. Os MCs imaturos circulam no sangue, atravessam a parede de vênulas e capilares e penetram nos tecidos, onde se proliferam e se diferenciam em células maduras e aí permanecem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Este tipo celular sintetiza, armazena e secreta heparina (uma glicosaminoglicana), aminas biogênicas serotonininas (só em ratos e camundongos) e histamina, além de mais outros dois fatores que atuam nas reações anafiláticas (KÜHNEL, 1989). A histamina tem efeito dilatador sobre os capilares e é liberada em maior quantidade nas reações alérgicas (KÜHNEL, 1989). Segundo Duffy et al. (1993) os MCs são importantes células efetoras nas respostas dos tecidos à infecções parasitárias e na inflamação alérgica.

Os mastócitos possuem na membrana citoplasmática receptores específicos e, estas células estão posicionadas em locais onde potenciais agentes patogênicos podem entrar no organismo. Por estarem presentes nos locais de entrada dos agentes agressores, e por não exigirem um recrutamento específico, estas células são consideradas células sentinelas das respostas inflamatórias locais (SHARMA; SAXENA, 2010).

Em um estudo de peles parasitadas por *Leishmania*, Maurer et al. (2006) observaram que os MCs dérmicos podem oferecer proteção contra a infecção por *L. major*, induzir e orquestrar reações locais de defesa do hospedeiro, bem como de respostas imunes sistêmicas. A grande degranulação de MCs em sítios de infecção por *L. major* já foram documentadas por Wershil et al. (1994); Saha et al. (2004) e Grimaldi; Soares; Moriearty, (1984), que observaram por análise histomorfométrica a desgranulação dos MCs em locais da pele infectados após seis horas de inoculação da *L. major*.

Os mastócitos são importantes células efetoras nas respostas dos tecidos à infecção parasitária. Mais recentemente, Starke-Buzetti; Silva; Neves (2012)

realizaram um estudo de quantificação de células mastócitos no intestino de cães infectados naturalmente com amastigotas de *L. infantum*. Os resultados mostraram que 45,5% dos cães apresentavam o parasita dentro de macrófagos ou livres nas diferentes camadas (mucosa, submucosa e muscular) da parede do intestino delgado e grosso e, estavam associados com o encontro de mastócitos, indicativo de hiperplasia celular em decorrência da presença do parasita.

2.8 Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

Em cães infectados com *L. infantum*, ocorre uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ concomitante à proliferação do parasito nos macrófagos, o que sugere ausência de resposta imune efetiva no sentido de eliminar o parasito (BOURDOISEAU et al., 1997). O contrário foi observado em camundongos da linhagem BALB/c altamente suscetível à infecção por *L. amazonensis*, a redução de linfócitos T CD4⁺ resultou na redução do tamanho de lesão, da carga parasitária e da incidência de metástase, demonstrando o importante papel dos linfócitos T CD4⁺ na progressão da infecção por esta espécie de parasita (SILVA; BERTHO; MENDONÇA, 1994).

Em um estudo experimental com camundongos da linhagem BALB/c comparando a correlação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ para as espécies de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, Carvalho (2012) observou que na evolução da infecção, as células T CD4⁺ aumentaram em camundongos infectados com *L. braziliensis*, e concomitantemente uma regressão da infecção parasitária. Já os camundongos infectados com *L. amazonensis* as células T CD4⁺ mantiveram se estáveis. Dados similares foram obtidos quando se analisou a presença de células CD8⁺ na evolução da infecção, porém, os camundongos infectados com *L. amazonensis* apresentaram uma grande redução de linfócitos T CD8⁺. Contudo diferentes espécies de parasita, mesmo que pertencentes ao mesmo gênero podem desencadear respostas imunológicas diferentes, onde a presença e/ou ausência dessas células tornam-se primordiais para compreender o agravamento da doença (CARVALHO, 2012).

A perda das células T CD4⁺ permite que flebotomíneos durante a progressão da infecção no cão tenha maiores chances de infectar-se, e isso é indicativo que a falta da capacidade de controlar o parasitismo permite ao animal a disseminação do parasito para outros tecidos, aumentando a carga parasitária (ALVAR et al., 2004).

Essa imunossupressão é uma consequência, em parte, da diminuição de células T CD4⁺. Portanto, o grande número de parasitos observados no baço pode ser uma consequência de uma disfunção imunológica, permitindo a multiplicação e disseminação do parasito para vários órgãos incluindo estômago, intestino e pulmão (HERVÁS et al., 1996).

Os linfócitos T CD8⁺ estão subdivididos em linfócitos T citotóxicos 1 (Tc1) e T citotóxicos 2 (Tc2). As células Tc1 são capazes de destruir células infectadas por meio de perforinas e/ou de mecanismos associados à expressão de Fas/CD95L que inicia o processo de apoptose via ativação da caspase 8, e, uma forte produção de IFN- γ e TNF- α . Já os linfócitos Tc2 destroem microrganismos intracelulares pela via das perforinas e granzimas, sendo capazes de produzir principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 (DOBRZANSKI et al., 2004).

Na infecção com *L. major* foi demonstrado que as células T CD8⁺ estão relacionadas com a eliminação do parasita e com o estabelecimento e a manutenção da imunidade contra a infecção. Assim, as células T CD8⁺ participam diretamente na produção de IFN- γ e na regulação da produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ (MÜLLER et al., 1991; HERATH; KROPF; MÜLLER, 2003).

2.9 Linfócito T regulatório (Treg): FOXP3⁺

A FoxP3 (Forkhead Fox P3) é uma proteína que atua como componente chave na regulação do desenvolvimento e função de linfócitos Treg (BOER et al., 2007), sendo considerada por Fontenot; Rudensky, (2005) um excelente marcador de célula Treg. De acordo com Abbas; Lichtman (2005) e Torgerson; Ochs (2007) a FoxP3 é um fator de transcrição, cuja função é exercida sobre regiões reguladoras específicas dentro do DNA, aumentando ou suprimindo a transcrição de genes específicos. Torgerson; Ochs (2007) acreditam ainda que a FOXP3 exerça função

efetora e facilitadora sobre os genes de proteínas chaves na ativação celular, incluindo a IL-2 e o GM-CSF.

Segundo Boer et al. (2007) a FOXP3 é quase exclusiva das células que expressam CD4 e CD25, e devem expressar também GITR (Glucocorticoid-Induced TNF receptor), podendo a FoxP3 atuar como um fator de transcrição que induz GITR.

Para Wan; Flavell (2007) a diminuição da expressão de FoxP3 pode levar a doenças autoimunes, por meio de doses dependentes através da transformação das células Treg em células efetoras, as quais instruiriam uma diferenciação Th2 nas células T convencionais.

Em camundongos susceptíveis à *Leishmania*, as células Treg promovem uma supressão das respostas imunes excessivas mediadas pelas células Th2 e, em animais resistentes, a Treg controla a resposta Th1 permitindo a presença do parasita e a manutenção da imunidade contra reinfecção (MENDEZ et al., 2004). Logo, se a FoxP3⁺ atua como chave reguladora das células Treg, sua ação se estende às ações das Treg no controle das leishmanioses.

Entretanto, a efetiva atuação das células Treg por meio do fator de transcrição FoxP3⁺ no trato intestinal de cães com ou sem amastigotas de *L. infantum* ainda não está bem definida.

3 JUSTIFICATIVA

Como pode ser visto nesta revisão, são diversas alterações, implicações e tipos celulares que atuam no controle das diferentes espécies do parasita *Leishmania*. Muitas células auxiliam na resposta imune do hospedeiro e interferem na relação organismo e patógeno. No entanto, com tantos mecanismos efetores existentes, permanece evidente a manifestação clínica da enfermidade nos animais e a presença do parasita em diferentes órgãos, incluindo o trato intestinal, ainda pouco estudado em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

O intestino é um órgão de extrema relevância aos animais, pois é o responsável pela absorção de nutrientes, reabsorção de água e que possibilita a manutenção do organismo com relação ao gasto energético. No que diz respeito a cães com leishmaniose, ressalta-se emagrecimento severo dos animais em estágio avançado da doença, um dos sinais clínico evidente da LVC (MARZOCHI et al., 1985). No entanto, pouco se conhece sobre as alterações da parede intestinal ao nível celular, dos animais acometidos com essa enfermidade como, por exemplo, o perfil das células inflamatórias na mucosa; das células apresentadoras de antígeno e das células efetoras ou regulatórias. Dessa forma, destaca-se a importância do estudo em determinar os diferentes perfis celulares na parede intestinal e correlacioná-los com o grau do parasitismo por *Leishmania* intestinal, com a histopatologia e com o quadro clínico dos cães em diferentes intensidades de parasitismo na mucosa intestinal.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo sobre o perfil das células monocíticas e granulocíticas na parede intestinal de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, caracterizados de acordo com a presença ou ausência do parasita no intestino. Além disso, realizou-se um estudo de correlação entre a intensidade parasitária, os fatores clínicos do hospedeiro, as células estudadas e as alterações histopatológicas da parede intestinal relacionadas com a presença das formas amastigotas de *L. infantum*.

Por este estudo, os diferentes assuntos foram abordados separadamente em cinco capítulos, discriminados abaixo:

→ **CAPÍTULO 01:** revisão bibliográfica com uma abordagem geral sobre LVC (etiologia, transmissão, vetores, reservatórios, importância para o homem e os animais, epidemiologia, diagnóstico e controle) e sobre a participação das células granulocíticas e monocíticas frente à infecção por *Leishmania* spp. em cães.

→ **CAPÍTULO 02:** seleção dos animais para formação dos grupos experimentais mediante a realização de diferentes técnicas (sorológicas, histoquímicas, imunoistoquímicas, moleculares e coproparasitológicas).

→ **CAPÍTULO 3:** detecção das formas amastigotas de *L. infantum* na parede intestinal e descrição histopatológica das lesões. Estudo de comparação entre a intensidade parasitária, o estado clínico dos animais, e as alterações estruturais micro e macroscópicas da mucosa intestinal de cães dos grupos G1, G2 e G3, e correlação dessas variáveis com os cães do G1.

→ **CAPÍTULO 4:** quantificação e correlação do perfil de células granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) na mucosa intestinal de cães dos grupos G1, G2 e G3.

→ **CAPÍTULO 5:** análise semiquantitativa da presença de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e macrófagos no trato intestinal de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* com a presença ou ausência do parasito no intestino.

5 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2005. p. 225-243.
- ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 716-717.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ASHFORD, D. A. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. 2000. **International Journal for Parasitology**, London, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- BOER, O. J.; VAN DER LOOS, C. M.; TEELING, P.; VAN DER WAL, A. C.; TEUNISSEN, M. B. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FoxP3 and GITR on CD4⁺ CD25⁺ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 55, n. 9, p. 891-898, 2007.
- BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 59, p. 21-30, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**: normas e manuais técnicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006a. 120 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave**: normas e condutas. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006b. 60 p.
- CARDOSO, L.; CABRAL, M. *Leishmania* e leishmaniose canina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, Lisboa, n. 13, p. 121-141, 1999.
- CARVALHO, A. K. **Correlação do perfil das células dendríticas com a resposta imune celular T CD4⁺ e T CD8⁺ na infecção experimental do camundongo BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonenses* e *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2012. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- CASTRO, A. G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar)**: normas técnicas. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 88 p.

CHIAPELLA, A. Diagnosis and management of chronic colitis in the dogs and cat. In: KIRK, R. (Ed.). **Current veterinary therapy**. 9. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 896-993.

CLAUSEN, B. E.; KEL, J. M. Langerhans cells: critical regulators of skin immunity?. **Immunology and Cell Biology**, London, v. 88, p. 351-360, 2010.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Belo Horizonte, v. 34, p. 223-228, 2001.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 75-87, 1955.

DE LUCA, P. M.; MAYRINK, W.; ALVES, C. R.; COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P.; BERTHO, A. L. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Vaccine**, London, v. 17, p. 1179-1185, 1999.

DESREUMAUX, P. A.; JANIN, A.; COLOMBEL, J. F. Interleukin-5 mRNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with celiac disease. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 175, p. 293-296. 1992.

DOBZANSKI, M. J.; REOME, J. B.; HOLLENBAUGH, J. A.; DUTTON, R. W. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 172, p. 1380-1390, 2004.

DUFFY, J. P.; SMITH, J. P.; MATTEWS, H. R. Combined staining method for demonstration of tissue eosinophils and mast cells. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, Thousand Oask, v. 16, n. 2, p. 143-144, 1993.

FAUST, E. C.; D'ANTONI, J. S.; ODOM, V.; MILLER, M. J.; PERES, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L. F.; TOBIE, J.; WALKER, J. H. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. **American Journal of Tropical Medicine**, Deerfield, v. 18, p. 169-183, 1938.

FAVALI, C.; TAVARES, N.; CLARENCIO, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKY, C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **Journal Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 82, p. 1401-1406, 2007.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais state. Brasil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, p. 161-173, 2003.

FUZISSAKI, C. N. **Estudo da modulação de funções efectoras de neutrófilos humanos por derivados cumarínicos: avaliação do efeito biológico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e a degranulação.** 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nature Immunology**, New York, v. 6, n. 4, p. 331-337, 2005.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental.** 1993. 202 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GONZÁLES, J. L.; INSA, F.; NOVOA, C.; PIZARRO, M. Intestinal amyloidosis in hamsters with visceral leishmaniasis. **British Journal of Experimental Pathology**, Chichester, v. 67, n. 3, p. 353-360, 1986.

GONZÁLES, J. L.; FERMIN, M. L.; GARCIA, P.; ROLLAN, E.; CASTAÑO, M. Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B.* **Journal of Veterinary Medicine**, New York, v. 37, n. 5, p. 377-382, 1990.

GRIMALDI, G.; SOARES J. R.; M. J.; MORIEARTY, P. L. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Chichester, v. 6, p. 397-408, 1984.

GUELRARD, P.; LAPLANTE, A.; RONDEAU, C.; GENVLÈVE, M.; DESJARDLNS M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigote in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cellular Microbiology**, Chichestre, v. 10, n. 1, p. 100-111, 2008.

HERATH, S.; KROPF, P.; MÜLLER, I. Cross-talk between CD8(+) and CD (+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. **Parasite Immunology**, Chichester, v. 25, n. 11-12, p. 559-567, 2003.

HERVÁS, J.; MENDEZ, A.; CARRASCO, L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C. Pathological study of visceral leishmaniasis in a Jackal. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 293-295, 1996.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 354, n. 9185, p. 1191 - 1199, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2008. 311 p.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H. K.; JOHNSON, A. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 21, p. 74-79, 1984a.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; JOHNSON, A. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. Pathology. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 21, p. 80-86, 1984b.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2002, Sevilla. **Proceeding of the...** Sevilla: [s.n.], 2002. p. 57-68.

KONECNY, P.; STAGG, A. J.; JEBBARI, H.; ENGLISH, N.; DAVIDSON, R. N.; KNIGHT, S. C. Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce ILN 12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. **European Journal Immunology**, Weinheim, v. 29, p. 1803–1811, 1999.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E. M.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5 n. 6, p. 1155, 2011.

KÜHNEL, W. **Atlas de citologia, histologia, e anatomia microscópica para teoria e prática**. 7. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. New York: Academic Press, 1987. v. 1, p. 291-363.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 811-827, 2005.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. V.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses**. 2010. Tese (Livro-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LEVY, A. M.; KITA, K. The Eosinophil in gut Inflammation: effector or director? **Gastroenterology**, Maryland Heights, v. 110, n. 3, p. 952-954, 1996.

LIEW, F. Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M. J. Macrophage Killing of *Leishmania* parasites in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 144, p. 4794-4797, 1990.

LONGSTAAFF, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F.; BEDFORD, P. G. C.; HERRTAGE, M. E.; DARKE, P. G. G. Leishmaniasis imported dogs in the United Kingdom: a potencial human health hazard. **Small Animal Practice**, Monrovia, v. 24, p. 23-30, 1983.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2005.

MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; TOLEDO L. M.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; RANGEL, Jr F. B.; TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 349-357. 1985.

MAURER, M.; KOSTKA, S. L.; SIEBENHAAR, F.; MOELLE, K.; METZ, M.; KNOP J.; STEBUT, E. V. Skin mast celles control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. **The FASEB Journal – Research Communication**, Bethesda, v. 20, p. 2460-2467, 2006.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, Cambridge, v. 119, p. 237-246, 1999.

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

MCKAY, D. M.; BIENENSTOCK, J. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. **Immunology Today**, Oxford, v. 15, p. 533-538, 1994.

MENDEZ, S.; RECKLING, S. K.; PICCIRILLO, C. A.; SACKS, D.; BELKAID, Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persisten leishmaniasis and control of concomitant immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 200, n. 2, p. 201-210, 2004.

MENDLOVIC, F.; FLISSER, A. Dendritic cells in the Gut: Interaction with intestinal Helminths. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2010, 10 p., article ID 250563, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/250563/>>. Acesso em: 20 out. 2014.

MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA DE CASTRO, J. A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. Canine leishmaniasis: na update. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings of the...** Barcelona: [s.n.], 1999. p. 46-53.

MOQBEL, R.; LEVINSACHAFFER, F.; KABY, A. B. cytokine generation by eosinophils. **Journal Allergy Clinical Immunology**, Philadelphia, v. 94, p. 1183-1188, 1994.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and experimental model. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MOREIRA-JUNIOR, E. D.; SOUZA, V. M. M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N.; BARRETO, R. B.; CARVALHO, L. P. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine**, Hanover, v. 69, p. 393-397, 2003.

MÜLLER, I.; PEDRAZZINI, T.; KROPF, P.; LOUIS, J.; MILON, G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. **Institute Immunology**, Basel, v. 3, n. 6, p. 587-597, 1991.

MURRAY, H. W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and Killing by normal macrophages. **Journal Experimental Medicine**, New York, v. 153, p. 1302-1315, 1981.

NADERER, T.; VINCE, J. E.; McCONVILLE, M. J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Current Molecular Medicine**, Bussum, v. 4, n. 6, p. 649-665, 2004.

NADERER T.; McCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, Chichester, v. 10, n. 2, p. 301-308, 2008.

NIETO C. G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J. M.; MIRÓN, C.; SOTO M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 117-130, 1999.

OLIVEIRA, R. S.; MACIEL, J. N. Aspectos socioeconômicos da leishmaniose visceral em João Pessoa Paraíba – Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 7, n. 1, p. 63-70, 2003.

PALATNIK-DE SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇANSILVA, J. C.; COSTA R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impacto of canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 65, p. 510-517, 2001.

PEARSON, R. D.; MARCUS, J. L.; SYMES, P. H.; ROMITO, R.; DONOVITZ, G. R. Failure of the phagocytic oxidative responses to protect human monocyte-derived

macrophages from infection by *Leishmania donovani*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 129, p. 1282-1286, 1982.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 1981.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 949-950, 1934.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A. M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J. A.; RUITENBERG, E. J.; RUTTEN, V. P. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-*Leishmania* activity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 92, p. 181-189, 2000.

QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis* dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4⁺ T cells in vivo. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 167, p. 4534-4542, 2001.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 13, p. 151-177, 1995.

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, DF, v. 3, n. 11, p. 13-14, 1997.

RITTING, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, Oxford, v. 16, p. 292-297, 2000.

RODRIGUES, C. A. T.; BATISTA, L. F. S.; TEIXEIRA, M. C. A.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, P. O. M.; OLIVEIRA, G. G. S.; FREITAS, L. A. R.; VERAS, P. S. T. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 143, p. 197-205, 2007.

ROGERS, M.; KROPF, P.; CHOI, B. S.; DILLON, R.; PODINOVSKAIA, M.; BATES, P.; MULLER, I. Proteophosphoglycans resuscitated by *Leishmania*-infected and flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 8, e1000555, Aug. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2722086/>>. Acesso em: 30 out. 2014.

ROSS, R. (1) note on the bodies recently described by *Leishmania donovani* and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, London, v. 2, p. 1261-1401, 1903.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAHA, B.; TONKAL, A. M.; CROFT, S.; ROY, S. Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus immune evasion in Leishmaniasis. **Clinical Experimental and Immunology**, West Sussex, v. 137, p. 19-23, 2004.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve uma visão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SCOTT, P.; HUNTER, C. A. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. **Current Opinion in Immunology**, Oxford, v. 14, p. 466-470, 2002.

SHARMA, R.; SAXENA, S. Comparative study of presence of mast cells in periapical granulomas and periapical cysts by toluidine blue and astra blue: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. **International Journal Oral-Medical Science**, West Sussex, v. 9, n. 1, p. 17-25, 2010.

SILVA, C. B.; VILELA, J. A. R.; PIRES, M. S.; SANTOS, H. A.; FALQUETO, AL. PEIXOTO, M. P.; OLIVEIRA, T. A.; SANTOS, F. N.; SILVA, V. L. SANAVRIA, A.; MASSARD, C. L. Serological aspects of *Leishmania* spp. In dogs in the Itaguaí micro-region, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 39-45, 2013.

SILVA, D. T.; STARKE-BUZETTI, W. A.; FERREIRA, A. G.; LINS, A. G. S.; SILVA, M. F. Presença de amastigotas de *Leishmania* em intestino de cães detectadas pela imunoistoquímica. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO DA UNESP, 2011, Ilha Solteira. **Annais...** Ilha Solteira: [s.n.], 2011.

SILVA, E. M.; BERTHO, A. L.; MENDONÇA, S. C. Effect of in vivo depletion of CDA+ T cells on experimental infection os susceptible BALB/c mice with *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 111-120, 1994.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 450-458.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psycchodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

STARKE-BUZETTI, W. A.; SILVA, D. T.; NEVES, M. F. Células mastócitos em tecidos intestinais de cães positivos para *Leishmania infantum*. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA-CBPV, 17., 2013, São Luiz. **Anais...** São Luiz: [s.n], 2013.

SUZUE, K.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T.; SUZUKI, M.; KOYASU, S. Critical role of dendritic cells in determining the Th 1/Th2 balance upon *Leishmania major* infection. **International Immunology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 337-343, 2008.

TACCHINI-COTTIER, F.; ZANDBERGEN, G. V. (Eds.). **Neutrophils in infectious diseases**. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2011.

TALLEY, N. J.; KEPHART, G. M. MCGOVERN, T. W. CARPENTER, H. A.; GLEICH, G. J. Deposition of eosinophil granule major basic protein in eosinophilic gastroenteritis and celiac disease. **Gastroenterology**, Maryland Heights, v. 103, p. 137-145, 1992.

TERRAZAS, C. A.; TERRAZAS, L. I.; GÓMEZN-GARCIA, L. Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2010, article ID 357106, 19 p., 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/357106/>>. Acesso em: 30 out. 2014.

TORGERSON, T. R.; OCHS, H. D. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. **Current Opinion in Allergy Clinical Immunology**, Philadelphia, v. 7, n. 6, p. 515-521, 2007.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. Leishmanioses. In: _____. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 191-192.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GERBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 173, p. 6521-6525, 2004.

VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; JAKOB, T.; SACKS, D. L.; UDEY, M. C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. **Journal Experimental Medicine**, New York, v. 188, p. 1547-1552, 1998.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated FOXP3 expression. **Nature**, London, v. 445, n. 15, p. 766-770, 2007.

WERSHIL, B. K.; THEODOS, C. M.; GALLI, S. J.; TITUS, R. G. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. **Journal of Immunology**, Bethesda, n. 152, p. 4563-4571, 1994.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 644-645, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record. **Relevé Épidémiologique Hebdomadaire**, Geneva, v. 77, n. 44, p. 365-372, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2002/wer7744.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2014.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cells signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 45, n. 12, p. 3371-3382, 2008.

**CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO DOS CÃES PARA A FORMAÇÃO DOS GRUPOS
EXPERIMENTAIS NOS ESTUDOS DE LEISHMANIOSE INTESTINAL**

**CHAPTER 2 - DOGS SELECTION FOR EXPERIMENTAL GROUPS IN STUDIES
OF INTESTINAL LEISHMANIASIS**

SELEÇÃO DOS CÃES PARA A FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS NOS ESTUDOS DE LEISHMANIOSE INTESTINAL

RESUMO- O objetivo deste capítulo foi selecionar cães com e sem leishmaniose visceral canina (LVC) e sem coinfecção parasitária intestinal para formar três grupos experimentais. Estes grupos foram utilizados nos trabalhos experimentais descritos nos capítulos 3, 4 e 5. Do total de 39 cães, 36 tinham LVC e foram doados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira e, três cães que não tinham leishmaniose (grupo controle), vieram a óbito por acidentes em atropelamento no trânsito ou morte em procedimentos cirúrgicos. Os cães com LVC foram submetidos à eutanásia na sede do CCZ de Ilha Solteira obedecendo ao Decreto nº 51.838 do Ministério da Saúde, Brasil, conforme procedimentos aprovados pela resolução 1000/2012 do CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária). Para este estudo, todos os animais foram submetidos a diferentes técnicas sorológicas como ELISA (ensaio imunoenzimático indireto) e RIFI (reação de imunofluorescência indireta) e a análise molecular como a PCR (reação em cadeia pela polimerase) para a confirmação do diagnóstico da LVC. A verificação da possível coinfecção com outros parasitas intestinais deu-se por meio de exames coproparasitológicos específicos. Somente cães sem coinfecção parasitária no trato intestinal foram selecionados para formar os grupos experimentais. Após a eutanásia e/ou morte natural dos cães, fragmentos das porções de intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon) foram coletados, fixadas em solução formalina tamponada a 10%, tratadas de acordo com as técnicas de histoquímica (HE) e imunoistoquímica (IMIQ) para detecção de formas amastigotas de *Leishmania Infantum*. Dos 39 cães avaliados, 19 foram descartados devido à coinfecção parasitária intestinal, e 20 animais livres de outros parasitas no trato intestinal foram divididos em três grupos de acordo com as seguintes características: O grupo um (G1) foi composto por oito cães (n = 8) com LVC e com amastigotas de *L. infantum* no intestino, o grupo dois (G2) por nove cães (n = 9) positivos para LVC e sem *L. infantum* no intestino e, o grupo três (G3) por três cães (n = 3) negativos para LVC (grupo controle).

Palavras-chave: Histologia. Imunoistoquímica. Intestino. Leishmaniose visceral canina.

DOGS SELECTION FOR EXPERIMENTAL GROUPS IN STUDIES OF INTESTINAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT- The aim of this chapter was to select dogs with and without canine visceral leishmaniasis (CVL) and without intestinal parasitic coinfection to form three groups. These groups were used in the experimental work described in chapters 3, 4 and 5. It was selected 39 dogs, which 36 were positive for CVL and were donated by the Animal Control Center (CCZ) from Ilha Solteira, SP, Brazil, and three dogs that had no leishmaniasis (control group), came to natural death due to accidents in traffic or trampling death in surgical procedures. The positive dogs for CVL were euthanized by the CCZ of Ilha Solteira according to the Decree No. 51,838 of the Ministry of Health, Brazil, according to procedures approved by Resolution 1000/2012 of CFMV (Federal Board of Veterinary Medicine). For this study, all animals were subjected to different serological techniques such as ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) and IFAT (immunofluorescence antibody test) and molecular analysis such as PCR (polymerase chain reaction) to confirm the diagnosis of CVL. The verification of possible co-infection with other intestinal parasites was performed by means of specific coproparasitological examinations. Only dogs without parasite coinfection in the intestinal tract were selected to form the experimental groups. After euthanasia and/or natural death of the dogs, fragments, portions of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) and the large intestine (colon) were collected, fixed in buffered formalin solution to 10% treated according to the techniques of histochemistry (HE) and immunohistochemistry (IMIQ) for detection of amastigotes of *Leishmania infantum*. 19 were discarded because of intestinal parasitic infection and, 20 animal without other parasites in the intestinal tract were divided into three groups according to the following features: Group 01 (G1) comprised eight dogs (n = 8) with CVL and amastigotes of *L. infantum* in the gut; group 02 (G2) with nine dogs (n = 9) positive for CVL and without *L. infantum* in the intestine and, group 03 (G3) with three dogs (n = 3) negative for CVL (control group).

Keywords: Histology. Immunohistochemistry. Intestine. Canine visceral leishmaniasis.

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Animais e Local

Foram avaliados clinicamente por um médico veterinário e coletadas amostras biológicas de 39 cães provenientes dos municípios de Ilha Solteira e Andradina, estado de São Paulo. Deste total, 36 foram diagnosticados portadores de leishmaniose visceral canina (LVC) e submetidos à eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, e três não tinham leishmaniose, mas vieram a óbito por acidentes em atropelamento no trânsito ou morte em procedimentos cirúrgicos. Um animal negativo foi procedente de uma clínica veterinária de Andradina, SP.

Para este estudo, todos os animais foram submetidos a duas técnicas sorológicas como, ELISA (ensaio imunoenzimático indireto) e RIFI (reação de imunofluorescência indireta), e a análise molecular pela PCR (reação em cadeia pela polimerase) do sangue para a confirmação do diagnóstico da LVC previamente estabelecido pelo CCZ. Do mesmo modo, todos os cães foram submetidos também aos exames coproparasitológicos realizados *in vivo* ou no *post-mortem* para investigação da coinfeção parasitária.

1.2 Diagnóstico de LVC no inquérito epidemiológico

Durante o inquérito epidemiológico realizado pelos médicos veterinários do CCZ da cidade de Ilha Solteira, os cães foram diagnosticados com LVC. Portanto, os animais positivos foram submetidos à eutanásia obedecendo ao Decreto nº 51.838 do Senado Federal, Brasil, de 14 de março de 1963. Os testes executados para o diagnóstico da LVC durante o inquérito epidemiológico foram os seguintes:

a) exames parasitológicos diretos (esfregaço da punção aspirativa dos linfonodos poplíteos ou pré-escapular), corados pelo Kit Panótico Rápido (Laborclin®);

b) teste imunocromatográfico DPP (*Dual Parth Platform*) considerado um teste rápido e de triagem, com a confirmação pelo teste ELISA indireto (Biomanguinhos), realizado pelo Instituto Adolfo Lutz, Araçatuba/SP.

1.3 Autorização para coletas e aprovação do Comitê de Ética

Mediante solicitação à diretoria municipal de saúde e ao setor de vigilância sanitária e epidemiológica do município de Ilha Solteira, foi autorizada a liberação de coletas de material biológico dos cães com LVC após a eutanásia, realizada na sede do CCZ de Ilha Solteira por um médico veterinário, conforme relatado no documento da página xv deste trabalho.

Este trabalho teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS-Unesp), Departamento de Biologia e Zootecnia, sob expedição do protocolo nº 06/2014-CEUA (página xvi).

1.4 Anamnese e exame físico

Todos os cães passaram por anamnese médica veterinária para caracterização dos sinais clínicos. A primeira condição observada no animal foi o escore da condição corporal, conforme preconizado por Laflame, (1997). A inspeção da pele consistiu em observações como (alopecia, descamação, hiperqueratose, espessamento e nódulos intradérmicos sobre o focinho, orelhas externas e/ou coxins), a coloração das mucosas (ocular, bucal e genital), unhas e palpação dos linfonodos (poplíteos, pré-escapular e submandibular) também foram averiguadas. Após a eutanásia dos animais, a condição do baço, fígado, rins, linfonodos mesentérico e intestinos foram observados e registrados.

Os cães foram classificados em assintomáticos quando não havia alteração clínica característica da LVC e, em sintomáticos quando apresentavam ao menos um sinal clínico citado acima de acordo com a caracterização da LVC descrita por Feitosa et al. (2000).

1.5 Eutanásia e necropsia

Os cães com LVC foram submetidos à eutanásia e necropsiados por médicos veterinários do CCZ de Ilha Solteira. Conforme resolução 1000/2012 do CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária) os animais receberam o medicamento pré-anestésico (MPA) Diazepam, de acordo com a dosagem recomendada pelo fabricante e, em seguida o anestésico geral, tiopental sódico (Thiopentax[®], SP, Brasil). Assim que o animal estava comprovadamente anestesiado, foi realizada a eutanásia por meio de aplicação intravenosa de uma solução concentrada de cloreto de potássio (10%). Após constatação da morte iniciou-se os trabalhos onde, na posição em decúbito dorsal, foi realizada incisão sobre a linha Alba, para acessar os órgãos dentro da cavidade. O intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foi separado do intestino grosso (cólon ascendente) e, antes da coleta dos tecidos para a histopatologia, a mucosa intestinal foi analisada e classificada de acordo com sua aparência macroscópica.

1.6 Coleta de amostras biológicas

Para este trabalho, foram coletadas amostras de fezes, sangue, tecidos do intestino delgado e grosso, linfonodos mesentéricos e também do conteúdo intestinal desses cães.

O sangue foi separado em dois tubos, um com EDTA (anticoagulante) para a PCR, cujo objetivo foi investigar a presença do DNA do parasita no sangue, e o outro para obtenção do soro, para confirmação dos testes sorológicos de diagnóstico da LVC por meio do ELISA e da RIFI.

Os segmentos do intestino delgado e grosso desses animais foram separados e lavados com solução salina tamponada (SST) (1,93g de NaHCO₃, 0,37g de KCl e 14,4g de NaCl) para retirada de impurezas presente no trato intestinal. Após, fragmentos de 0,5 a 1 cm dos intestinos e linfonodos mesentéricos foram fracionados, divididos e colocados em dois recipientes. Os primeiros fragmentos de cada órgão foram colocados em microtubos estéreis e estes imersos em nitrogênio líquido sendo em seguida, armazenados em freezer -80°C para posterior análise

molecular. Os outros fragmentos de cada órgão foram colocados em tubos contendo o fixador (formalina tamponada 10%) para os exames histopatológicos.

As coletas foram realizadas durante o ano de 2013 e 2014 na própria sede do CCZ de Ilha Solteira e em uma clínica veterinária de Andradina, sempre com o acompanhamento de um médico veterinário responsável.

1.7 Histologia

1.7.1 Histoquímica – Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E)

Após a eutanásia dos cães, as amostras de tecidos coletadas do trato intestinal foram fixadas em solução formalina tamponada a 10% (tampão fosfato 0,01M) por até 24 horas. Após esse período os tecidos foram lavados com álcool 70% e desidratados através de passagens sucessivas em etanol 70, 80, 90 e 100%. Posteriormente foi realizada a diafanização do tecido, a impregnação com parafina e a formação dos blocos. Os blocos foram congelados a -20°C e então submetidos à secção de cortes em micrótomo ($5\text{ }\mu\text{m}$) para montagem das lâminas histológicas. As lâminas foram submetidas às técnicas padrão de histologia e coradas por hematoxilina e eosina (HE), para os exames histopatológicos. A presença das amastigotas de *Leishmania* spp. foi avaliada sob um microscópio óptico, em três secções do tecido a partir de cada uma das amostras intestinais.

1.7.2 Imunoistoquímica – IMIQ

Para identificação das formas amastigotas de *L. infantum* nos tecidos por meio da imunoistoquímica, adotou-se a técnica de Tafuri et al. (2004) com algumas modificações feitas por Queiroz et al. (2011). As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas em peróxido de hidrogênio a 30% (Fluka Chemie AG CH-9470 Buchs) para bloquear a atividade da peroxidase endógena, seguindo-se à incubação com soro normal de cabra (diluição 1:50) para bloquear as reações inespecíficas da imunoglobulina com o tecido. O soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *L. infantum* (diagnosticado pelo ELISA e RIFI; com título

de 1:2560), foi usado como o anticorpo primário. O anticorpo secundário foi o anti-IgG de coelho biotinilado produzido em cabra (BA-1000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) (reação imunológica cruzada com IgG de cães). Após três lavagens adequadas em tampão fosfato 0,01M (pH = 7,4) os tecidos foram incubados com o complexo “Avidin-Biotin Peroxidase” (Vectastain ABC Kit PK 6200; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) que serviu para detecção da reação imunológica. Novamente os tecidos foram lavados e então adicionados a eles o substrato cromógeno específico para peroxidase (Nova RED™ substrate Kit SK-4800; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Após a reação e coloração das amastigotas, os tecidos foram lavados, contra corados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montadas com lamínulas em balsamo do Canadá.

1.8 Exames sorológicos – confirmação do diagnóstico

1.8.1 Imunoensaio enzimático indireto (ELISA)

O teste ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Machado et al. (1997) e adaptado por Oliveira et al. (2008) para *L. infantum*. O antígeno (Ag) utilizado foi o solúvel bruto obtido a partir de promastigotas desenvolvidas em cultivo celular de amastigotas provenientes de medula óssea de cães sintomáticos para LV, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-campus de Jaboticabal.

Para o teste ELISA, em cada cavidade da placa foi adicionado 100µL do antígeno solúvel de *L. infantum* na concentração 10µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6. Após os bloqueios das reações inespecíficas, das incubações e das lavagens necessárias, foram adicionadas as amostras dos soros dos cães a serem testadas na diluição de 1:400. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-cão produzido em coelhos, conjugado à enzima fosfatase alcalina (*rabbit anti-dog* IgG A-0793, Sigma). O substrato da enzima fosfatase alcalina foi o paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8 (SIGMA N-9389). A leitura da reação foi realizada em um leitor

de microplacas de ELISA (EL800 Universal Microplate Reader, BIO-TEK instruments), a um comprimento de onda de 405 nm.

Os valores de densidade óptica média (D.O.) dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variaram de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. dos animais negativos para *L. infantum*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por Voller et al. (1980).

A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos de acordo com a seguinte equação:

A/P=		-	
Absorbância média da amostra		Absorbância média do soro de referência negativo	
-		-	
Absorbância média do soro de referência positivo		Absorbância média do soro de referência negativo	

A absorbância média dos cães negativos foi (DO=0,1521) e o ponto de corte para o ELISA foi NE 03, (DO=0,3802).

1.8.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A RIFI foi realizada conforme a técnica utilizada pelo Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, de Belo Horizonte/MG, para diagnóstico de animais infectados por *L. infantum*, adaptada por Oliveira et al. (2008).

As lâminas contendo o antígeno promastigotas de *L. Infantum* foram retiradas do “freezer” e descongeladas à temperatura ambiente. Em cada círculo contendo o antígeno, foi dispensados 10µL de cada soro teste diluído na concentração de 1:40. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos e, a seguir, submetidas a três lavagens em PBS por imersão, de cinco minutos cada. Após a secagem a temperatura ambiente, os círculos das lâminas foram recobertos com 10µL do anticorpo anti-IgG de conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (KPK cat.

nº 02-19-02), diluído a 1:30, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1 mg%. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas conforme descrito acima. Após a secagem das lâminas, estas foram montadas com lamínula, utilizando-se glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5M, pH 9,6 e, posteriormente observadas em microscópio equipado para Fluorescência (Olympus, BX-FLA). Após a leitura em microscópio equipado para fluorescência, foram consideradas positivas as reações fluorescentes em soros com diluição $\geq$ 1:40.

1.9 Exame molecular: Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

1.9.1– Extração do DNA do sangue e do tecido

A extração do DNA total do sangue dos cães foi realizado pelo metodo *salting out* descrito por John et al. (1991) e por Lahiri; Nurnberger (1991) com algumas modificações. Resumidamente para cada 1 mL de sangue foram adicionados 300µL de solução lise, e centrifugado a 13.000 rpm por um minuto e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido até que se obteve um *pellet* limpo. Foi adicionada à amostra uma solução com a proteínase K e então congelada. Após o congelamento, as amostras foram aquecidas a 55° C com agitação periódica por três horas, em seguida, colocadas na geladeira 4° C por 15 minutos. A adição do NaCl 5M, em média 120 µL por amostra foi colocada e homogeneizada por 8 segundos. Retirou-se 400µl da mistura da amostra sem afetar o *pellet* e adicionamos 1 mL de etanol a 95% ou absoluto, seguido de homogeneização por inversão dos tubos de duas a três vezes. A amostra foi mantida no freezer a -20°C por 30 minutos e então centrifugada a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4° C, e o sobrenadante descartado. A amostra foi colocada em banho seco a 54° C até que o tubo secasse, e então, adicionou-se 40µL de água ultrapura, e por 15 minutos foi aquecida a 54° C para diluição do DNA, assim obteve-se o DNA sanguíneo extraído.

O DNA dos tecidos intestinais foram extraídos do duodeno, jejuno, íleo, e cólon de cada animal separadamente, utilizando-se o Kit QIAamp® DNA Mini Kit

(S1306 - QIAGEN, USA), para um volume final de 50 µL, seguindo-se as instruções do fabricante.

1.9.2 Amplificação do DNA – Região do cinetoplasto

Para a amplificação do DNA, um par de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* spp. foi usado de acordo com Rodgers et al. (1990): 13A 5'-dGTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' e 13B 5'-dATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3', para gerar um fragmento de DNA com 120 pares de base (pb). A mistura da reação consistiu de 1 U de Platinum® Taq polimerase (Invitrogen), 15,25 µL de água ultra pura e tampão para PCR, 1X (1,5 mM MgCl₂), 0,31 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,26 µM de primer "Forward", 0,26 µM de primer "Reverse" e 2,5 µL de extrato de DNA extraído do sangue total ou tecidos. Cada reação foi sujeita a 34 ciclos em um termo ciclador, com a quantidade de DNA variando de 50 a 300 ng, em volume final de 25µL. Controles positivos foram amostras de DNA de *Leishmania* extraído de *L. infantum* em meio de cultura (NUNES et al., 2007). Os controles negativos foram amostras de DNA extraído de sangue de cães sabidamente negativos. Produtos amplificados foram sujeitos à eletroforese em gel de agarose a 2%. O Brometo de etidium foi utilizado para a visualização da reação em trans-iluminador.

1.10 Análises coprológicas e do conteúdo Intestinal

A infecção parasitária por outros parasitas que não seja amastigota de *Leishmania* spp. foi determinada inicialmente pela visualização macroscópica de parasitas no conteúdo intestinal. Os intestinos foram abertos em seu sentido longitudinal e o conteúdo raspado da mucosa foi coletado e analisado em microscópio estereoscópico para identificar possíveis helmintos (larvas ou adultos). Os cães negativos para esse teste tiveram as fezes encaminhadas ao Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Biologia e Zootecnia, FEIS/Unesp, para exames coprológicos, cujo objetivo foi averiguar a presença de ovos de helmintos.

Para os exames coprológicos, as fezes colhidas diretamente do reto de cada animal foram analisadas por três métodos coprológicos (método de Willis-Mollay (1921); método de Gordon; Whitlock (1939) utilizando a câmara de McMaster; e o método de concentração por sedimentação espontânea (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934), para identificação de ovos dos helmintos, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de coccídeos. Esses três métodos se complementaram, permitindo maior confiabilidade na detecção e formação dos grupos. As amostras fecais dos animais negativos pelos testes acima ficaram em cultivo com dicromato de potássio 2%, em temperatura ambiente (6-10 dias) para esporulação dos possíveis oocistos. Para visualização e identificação dos oocistos, realizou-se a técnica descrita por Sheather (1923) de centrífugo-flutuação em solução saturada de sacarose. Além disso, foi empregado o método de coloração modificado de safranina a quente para identificação de espécies dos gêneros *Cyclospora*, *Cryptosporidium* e *Cystoisospora*.

1.11 Formação dos grupos

Para a formação de grupos foi indispensável que todos os cães estudados não estivessem coinfectados com outros parasitas intestinais. Animais coinfectados foram separados e não foram selecionados para a formação dos grupos experimentais. Com base nos exames sorológicos, histoquímicos, imunoistoquímicos, e coproparasitológicos, os animais foram selecionados e classificados em três grupos:

- Grupo 1 (G1): cães com LVC, por pelo menos um método diagnóstico sorológico (ELISA ou RIFI), ou molecular (PCR sangue), livres de outros parasitas intestinais, mas com amastigotas de *Leishmania* spp. no intestino que foram identificadas e visualizadas por meio da histoquímica (HE) e/ou imunoistoquímica (IMIQ);
- Grupo 2 (G2): cães com LVC por pelo menos um método (ver acima), livres de outros parasitas intestinais e sem amastigotas de *Leishmania* spp. no intestino, de acordo com a não visualização do parasita nas lâminas pelas técnicas de HE e IMIQ;

- Grupo 3 (G3): cães negativos para LVC em todas as técnicas (ELISA, RIFI, PCR, H&E e IMIQ) e também negativos para outras parasitoses (grupo controle).

2 RESULTADOS

Neste capítulo foi descrito como os cães foram avaliados quanto ao diagnóstico de LVC, a determinação da coinfecção parasitária intestinal e a identificação de amastigotas de *L. infantum* nos intestinos. Com base nessas informações, tais animais foram selecionados e classificados em três grupos experimentais que serviram de base para os trabalhos científicos descritos nos próximos capítulos.

Pela análise macroscópica dos intestinos detectou-se a presença de helmintos adultos em 13 cães e, pelas análises coprológicas foi possível identificar ovos de helmintos em três outros animais. Devido à qualidade das amostras coletadas e das fezes insuficientes, outros três cães não foram avaliados. Sendo assim 19 animais foram desclassificados para a formação dos grupos (Tabela 01).

Desta forma, 20 cães foram negativos para as análises do conteúdo intestinal e também para os exames coproparasitológicos específicos (Tabela 01). Para esses animais, realizaram-se os exames sorológicos (ELISA e RIFI) e exame molecular (PCR) que serviram de confirmação para o diagnóstico positivo e/ou negativo de LVC (Tabela 02).

Nos exames relatados acima, 85% (17/20) dos cães foram positivos para LVC por pelo menos uma técnica e, 15% (3/20) foram negativos em todas as técnicas. Nesse trabalho todos os animais positivos foram reagentes ao menos em duas técnicas.

Os exames histológicos (HE e IMIQ) realizados nas secções de tecidos intestinais do duodeno, jejuno, íleo e cólon, revelaram que 40% (8/20) dos cães apresentavam amastigotas de *L. infantum* em pelo menos uma porção intestinal. Os detalhes sobre a intensidade parasitária no intestino poderá ser mais bem observados no capítulo 3 deste trabalho. Em todos os oito cães com parasitas no intestino foi possível observar as amastigotas por ambas as técnicas (IMIQ e HE).

Com relação aos sinais clínicos, todos os cães com LVC (85%) eram sintomáticos. Apenas três cães, que foram negativos para a doença estavam assintomáticos. Dos cães com LVC, a maioria se mostrava debilitados, sendo que, alguns deles já estavam em um estágio bastante avançado da doença (Figura 01).

Muitos animais foram levados espontaneamente ao CCZ pelos proprietários, devido ao grande número de sintomas que apresentavam e, no exame parasitológico (aspirado de linfonodo poplíteo) desses animais, o parasita foi visualizado facilmente, culminando no encaminhamento dos cães para a eutanásia.

Os sinais clínicos observados com maior frequência foram: onicogrifose 13/20 (65%); lesões de pele 13/20 (65%); emagrecimento 12/20 (60%); linfonodos hipertróficos 11/20 (55%); alopecias 9/20 (45%); esplenomegalia 9/20 (45%); hepatomegalia 5/20 (25%), opacidade córnea 5/20 (25%) e diarreia 2/20 (10%) (Figura 1). Pela observação macroscópica, foram identificados três animais com diarreia e três cães com mucosa intestinal hemorrágica.

De acordo com a Tabela 02, oito animais com LVC nos exames histológicos (cães: 11, 14, 22, 29, 33, 34, 36 e 37) foram classificados como grupo um (G1). Os cães 11 e 14 foram negativos para o exame molecular (PCR do sangue), e o cão 37 pelo ELISA. Porém, para as outras técnicas todos foram positivos quanto à LVC.

Ainda na Tabela 02, observa-se que os nove cães (12, 15, 17, 18, 21, 26, 27, 30 e 38) negativos na histologia para o encontro de amastigotas, porém positivos para LVC, independentemente da técnica, foram agrupados como grupo dois (G2). Desses, o cão 12 foi negativo à PCR, porém positivo nos testes ELISA e RIFI, e os cães 21, 26 e 27 foram negativos apenas para a PCR do sangue. O grupo três (G3) foi o grupo controle, composto pelos cães (20, 25 e 39) por conter animais negativos em todas as técnicas. A dificuldade em obter cães negativos para LVC para formar o grupo controle sem infringir o código de ética foi grande, por isso, o “n” amostral para esse grupo (G3) foi inferior ao dos demais grupos (G1 e G2).

Desse modo, a formação dos grupos experimentais foi determinada da seguinte maneira: o grupo um (G1) ficou composto por oito cães (n = 8) com LVC e com amastigotas de *L. infantum* no intestino, o grupo dois (G2) por nove cães (n = 9) positivos para LVC e sem *L. infantum* no intestino e, o grupo três (G3) por três cães (n = 3) negativos para LVC, (Tabela 02).

3 REFERÊNCIAS

- FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.
- GORDON, H. M. C. L.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, Melbourne, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of Public Health Tropical Medicine**, Puerto Rico, v. 9, p.283-291, 1934.
- JOHN, S. W.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A. Rapid procedure for extraction genomic DNA leukocytes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 192, p. 408, 1991.
- LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. **Canine Practice**, Mission Viejo, v. 22, n. 3, p. 10-15, 1997.
- LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 5444, 1991.
- MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R.; VALADÃO, I. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.
- NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B.; AZEVEDO, M. A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.
- OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.
- QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NORONHA-JÚNIOR, A. C. F.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 3, n. 71, p. 267-275, 1990.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 36, p. 266-275, 1923.

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

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassay. In: ROSE, N.R.; FRIEDMAN, H. (Ed.). **Manual of clinical immunology**. 2. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1980. p.399-371.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for detection of hookworm ova. **The Medical Journal of Australia**, v. 8, p.375-376, 1921.

Figura 01. Cães sintomáticos e com LVC. A: cão debilitado que recebeu tratamento com alopurinol e dexametasona para leishmaniose; B: lesão no membro torácico esquerdo (seta); C: onicogrifose acentuada (seta); D: cão em estado de caquexia, com alopecias e onicogrifose; E: secreção ocular (seta) e magreza; F: linfonodo poplíteo infartado no membro pelvico esquerdo (seta), Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.



Tabela 01. Resultado das análises coproparasitológicas, das cropoculturas e da observação do conteúdo intestinal de 39 cães avaliados. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Análises Parasitárias para coinfecção com <i>Leishmania</i> spp.						
Animais	Análise Macro	Exames Coprológicos			Coprocultura	Situação
		Gordon	Willis	Hoffman		
Cão 01	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 02	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 03	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 04	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 05	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 06	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 07	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 08	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 09	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 10	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 11	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 12	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 13	N	+	+	NR	N	Reprovado
Cão 14	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 15	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 16	N	+	+	NR	NR	Reprovado
Cão 17	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 18	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 19	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 20	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 21	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 22	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 23	N	+	+	+	NR	Reprovado
Cão 24	N	N	N	N	N	Reprovado
Cão 25	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 26	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 27	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 28/24	N	N	N	N	N	Reprovado
Cão 29/25	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 30/26	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 31/27	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 32/28	N	N	N	N	N	Reprovado
Cão 33/29	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 34/30	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 35/31	+	NR	NR	NR	NR	Reprovado
Cão 36/32	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 37/33	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 38/34	N	N	N	N	N	Aprovado
Cão 39	N	N	N	NR	NR	Aprovado

Nota: (+): Positivo; (N): Negativo; (NR): Não realizado; Gordon: técnica de Gordon & Whitlock (1939); Willis: método de Willis-Mollay (flutuação de ovos de helmintos); Hoffman: Hoffman; Pons; Janer, (1934).

Tabela 02. Resultado dos cães avaliados quanto à positividade para LV e formação dos grupos, onde: G1: cães com LVC e com amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino; G2: cães positivos para LV e sem *L. infantum* no intestino; G3: cães negativos para LVC (controle). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Formação dos grupos de acordo com o diagnóstico para LVC							
Grupos	Nº	Animais	Sorológico		Molecular	Parasitológico	
			ELISA / (NE)	RIFI/Tit.	PCR	HE	IMIQ
G1	01	Cão 11	+ / 5	+ / 1:1280	N	+	+
	02	Cão 14	+ / 6	+ / 1:1280	N	+	+
	03	Cão 22	+ / 4	+ / 1:1280	+	+	+
	04	Cão 29	+ / 6	+ / 1:1280	+	+	+
	05	Cão 33	+ / 6	+ / 1:1280	+	+	+
	06	Cão 34	+ / 4	+ / 1:2560	+	+	+
	07	Cão 36	+ / 5	+ / 1:1280	+	+	+
	08	Cão 37	N / 0	+ / 1:320	+	+	+
G2	01	Cão 12	+ / 3	+ / 1: 320	N	N	N
	02	Cão 15	+ / 6	+ / 1:640	+	N	N
	03	Cão 17	+ / 3	+ / 1:640	+	N	N
	04	Cão 18	+ / 6	+ / 1:640	+	N	N
	05	Cão 21	+ / 3	+ / 1:640	N	N	N
	06	Cão 26	+ / 6	+ / 1:1280	N	N	N
	07	Cão 27	+ / 7	+ / 1:1280	N	N	N
	08	Cão 30	+ / 6	+ / 1:1280	+	N	N
	09	Cão 38	+ / 5	+ / 1:1280	+	N	N
G3	01	Cão 20	N / 0	N	N	N	N
	02	Cão 25	N / 0	N	N	N	N
	03	Cão 39	N / 0	N	N	N	N

Nota: (+): positivo; (N): negativo; (NE): Níveis ELISA; (Tit.): Titulação; HE: Histoquímica; IMIQ: Imunoistoquímica.

**CAPÍTULO 3 - AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum* EM TECIDOS
INTESTINAIS DE CÃES: DESCRIÇÃO HISTOPATOLÓGICA E ESTUDOS DE
CORRELAÇÃO PARASITÁRIA**

**CHAPTER 3 - AMASTIGOTES OF *Leishmania infantum* IN INTESTINAL
TISSUES OF DOGS: HISTOPATHOLOGICAL DESCRIPTION AND PARASITE
CORRELATION STUDIES**

AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum* EM TECIDOS INTESTINAIS DE CÃES: DESCRIÇÃO HISTOPATOLÓGICA E ESTUDOS DE CORRELAÇÃO PARASITÁRIA

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi a detecção das formas amastigotas de *Leishmania infantum* na parede intestinal, a descrição histopatológica das lesões, a comparação entre os grupos e o estudo de correlação entre a intensidade parasitária e as diferentes variáveis como: o estado clínico dos animais e as alterações estruturais micro e macroscópicas da mucosa intestinal de cães com ou sem leishmaniose visceral canina (LVC). Para este estudo, os animais foram subdivididos em três grupos: grupo 1 (G1, n = 8) cães positivos para LVC e com amastigotas de *L. infantum* no intestino; grupo 2 (G2, n = 9) cães positivos para LVC, sem amastigotas intestinais; e, grupo 3 (G3, n = 3) cães negativos para LVC, o grupo controle. Foram avaliados 20 cães quanto ao diagnóstico da LVC, e 17 estavam positivos e três negativos. Os cães positivos foram eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, SP. Já os cães negativos vieram a óbito natural por acidentes em atropelamento no trânsito ou morte em procedimento cirúrgico. Todos os animais não apresentavam coinfeção parasitária com parasitos gastrintestinais, mediante aos exames coproparasitológicos realizados *in vivo* ou *pos-mortem*. A identificação das amastigotas do parasita no intestino foi realizada por meio dos métodos histológicos e imunoistoquímicos. A análise de comparação estatística entre os grupos foi pelo teste de Kruskal-Wallis, e a análise de correlação foi de acordo com o teste de Spearman. 47,05% (8/17) dos cães positivos para LVC apresentavam formas amastigotas de *L. Infantum*, no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e no intestino grosso (cólon), em intensidades variadas na mucosa, submucosa e na camada muscular, embora com maior predominância na mucosa. Foi observada a primeira ocorrência desse parasita na musculatura do intestino delgado. A reação inflamatória mais destacada foi caracterizada por infiltrado crônico de células mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos (reações histiolinfoplasmocitárias). A comparação entre os grupos demonstrou que os cães do G1 foram os mais comprometidos, entretanto, este grupo não diferiu estatisticamente do G2 em todas as variáveis estudadas, mas ao nível da mucosa intestinal, o G1 apresentou diferenças estatísticas quando comparado com os cães do grupo G2 e o controle G3. Dessa forma, a intensidade parasitária por estar correlacionada com as alterações microscópicas observadas na mucosa intestinal, e estas com os sinais clínicos sistêmicos sugerem que os cães em estado mais avançado para LVC podem apresentar leishmaniose intestinal. Além disso, a coloração da mucosa ocular e bucal foi outro fator indicativo da presença desse parasita intestinal. Como conclusão, o parasita *L. infantum* pode infectar o intestino de cães e, por ser responsável pela alteração da integridade estrutural desse órgão pode comprometer o processo digestório, agravando ainda mais o quadro geral da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Cão. Histologia. Imunoistoquímica. Intestino. Leishmaniose.

AMASTIGOTES OF *Leishmania infantum* IN INTESTINAL TISSUES OF DOGS: HISTOPATHOLOGICAL DESCRIPTION AND PARASITE CORRELATION STUDIES

ABSTRACT – The aim of this study was the detection of amastigotes of *Leishmania infantum* in the intestinal wall, histopathological description of the lesions and the comparison between groups and correlation study among parasite intensity, the clinical signs of the animals and micro and macroscopic structural changes in the intestinal mucosa of dogs with or without canine visceral leishmaniasis (CVL). For this study, the animals were subdivided and three groups: group 1 (G1, n = 9) positive dogs, for CVL and with amastigotes of *L. infantum* in the intestine; group 2 (G2, n = 9) positive dogs for CVL, without intestinal amastigotes; and group 3 (G3, n = 3) negative dogs for CVL or control group. 20 dogs were evaluated for the diagnosis of CVL, and 17 were positive and three negative. Positive dogs were euthanized by the Center for Zoonosis Control of Ilha Solteira, SP. The negative control dogs were died by other reasons, such as traffic accidents. All dogs coinfecting with other intestinal parasites were not used for this study. The identification of amastigotes of the parasite in the intestine was done by histological and immunohistochemical methods. The statistical comparison analysis between groups was made by the Kruskal-Wallis test, and the correlation analysis was according to the Spearman test. 47.05% (8/17) of the positive dogs for CVL had amastigotes of *L. infantum*, in the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) and the large intestine (colon), which the parasites were found in different intensities in the mucosa, submucosa and muscle layer, although with more predominance in the mucosa. The first occurrence of this parasite in the muscles of the small intestine was observed here. The most intense inflammatory reaction was characterized by a chronic infiltration of mononuclear cells, mainly macrophages, lymphocytes and plasma cells (histiolymphoplasmocitary reaction). The comparison between groups showed that the G1 dogs were the most infected with intestinal amastigotes, however, this group did not differ statistically from G2 in all variables analysed, but the microscopic lesions observed in the intestinal mucosa showed significant difference when compared dogs from G1 with dogs from G2 or G3. Thus, the positive and statistical correlation among parasite intensity, the mucosal microscopic changes and the systemic clinical signs may be indicative of dogs in a more advanced state of CVL that may have intestinal leishmaniasis. Moreover, the color of the eye and oral mucosa may be also an indicative factor ($p \leq 0.05$) of the presence of this intestinal parasite. In conclusion, *L. infantum* parasite amastigotes present in the intestines may cause structural integrity changes in the intestines and consequently the digestive process alterations responsible for intensifying the general clinical status of the disease.

Keywords: Dog. Histology. Immunohistochemistry. Intestine. Leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A espécie *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*) é o agente etiológico da leishmaniose visceral no novo mundo (continente americano) com regiões endêmicas que se estende do Sul dos Estados Unidos ao Norte da Argentina, incluindo o Brasil (KUHLS et al., 2011).

A principal via de transmissão do parasita para o homem e outros mamíferos é por meio da picada de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia (L.) longipalpis* (Diptera; Psychodidae; Phlebotominae) (PORROZZI et al., 2006). Devido á estreita relação com os seres humanos, os cães desempenham um papel importante na epidemiologia desta zoonose. A pele canina é o sistema do corpo que mais comumente apresenta sinais de LVC e, a presença de parasitos de *Leishmania* spp. na pele do cão enfatiza a importância do papel desempenhado pelos canídeos domesticos no ciclo de vida do *L. infantum* (QUEIROZ et al., 2010). Uma vez inoculados na pele do hospedeiro, o parasita multiplica-se no interior do citoplasma de macrófagos, provocando alterações especialmente no fígado, nódulos linfáticos, baço e medula óssea (RIBEIRO, 1997).

Além dos órgãos citados, a infecção compromete também os rins, o sistema gastrintestinal, nervoso central e, o genital (BLAVIER et al., 2001). Clinicamente a leishmaniose canina clássica aparece como uma doença crônica, promovendo o surgimento de anemia, lesões cutâneas, linfadenopatia generalizada, glomerulonefrite, epistaxe, colite crônica, diarreia hemorrágica, artrite e, lesões oftálmicas (CHAPMAN; HANSON, 1984; CHANG et al., 1985; FERRER et al., 1991; CIARAMELLA et al., 1997; BLAVIER et al., 2001; TAFURI et al., 2001).

Uma reação inflamatória no trato gastrintestinal, associada com a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. intramacrofágica foi relatada em cães experimentalmente (KEENAN et al., 1984a,b; CHIAPELLA et al., 1986) e naturalmente infectados (FERRER et al., 1991; PINTO et al., 2011; TOPLU; AYDOGAN, 2011). Embora raras, as ocorrências de colite erosiva e ulcerativa, e diarreia hemorrágica, por vezes, têm sido descrita em cães, em associação com

sinais clínicos graves desta doença (FERRER et al., 1991). Em outros estudos experimentais, Gonzales et al. (1986) mostraram que a LV ocasionou alterações patológicas na lâmina própria e submucosa intestinal de hamsters com infiltração de células inflamatórias como linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Eles também observaram degeneração de células epiteliais e leve hipertrofia nas placas de *Peyer*. Além disso, Gonzales et al. (1990) relataram macrófagos infectados por *L. infantum* presentes na mucosa e submucosa associados com infiltração inflamatória difusa de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. Uma degeneração da camada epitelial, erosão da mucosa e diminuição do tamanho das criptas *Lieberkühn* também foram observadas.

Recentemente, Silva et al. (2002) e Pinto et al. (2011) descreveram as reações crônicas inflamatórias intestinais compostas principalmente por macrófagos, plasmócitos, linfócitos e raros neutrófilos em cães com LVC, clinicamente assintomáticos. A análise imunoistoquímica revelou macrófagos com formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* na lâmina própria.

Como pode ser observado na literatura, embora o parasita *L. infantum* já tenha sido detectado em tecidos intestinais de cães com LVC, pouco ainda se conhece sobre a sua patogênese nesse órgão. Dessa forma, o presente trabalho objetivou realizar um estudo histopatológico das lesões observadas no intestino e a correlação da intensidade parasitária, com as alterações estruturais da mucosa e com o status clínico dos cães acometidos com LVC.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e local

Para esse estudo, foram utilizados 20 cães provenientes dos municípios de Ilha Solteira e Andradina, localizados na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. Desses animais, 17 foram diagnosticados com LVC e submetidos à eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, e três não tinham leishmaniose (grupo controle), mas vieram a óbito por acidentes em atropelamento no trânsito ou morte em procedimento cirúrgico. Nenhum animal apresentava coinfeção parasitária com parasitas gastrintestinais, comprovado mediante exames

coproparasitológicos realizados *in vivo* ou *pos-mortem* conforme descrito no capítulo 2, item 1.10.

Este trabalho teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS-Unesp), Departamento de Biologia e Zootecnia, sob expedição do protocolo nº 06/2014-CEUA.

2.2 Anamnese e exames físicos

Os cães foram classificados em assintomáticos quando não havia alteração clínica e, em sintomáticos quando apresentavam ao menos um sinal clínico conforme a caracterização da LVC descrita por Feitosa et al. (2000). Todas as condições clínicas observadas nos animais foram registradas e podem ser melhor esclarecidas no capítulo 2, item 1.6.

2.3 Diagnóstico de LVC e eutanásia dos cães

Os cães foram diagnosticados com LVC durante o inquérito epidemiológico da doença no município de Ilha Solteira, realizado pelo CCZ da cidade. A condição para o diagnóstico seguiu os procedimentos descritos no Capítulo 2.

Os animais foram submetidos à eutanásia obedecendo ao Decreto nº 51.838 do Senado Federal da Saúde, Brasil, conforme procedimentos aprovados pela resolução 1000/2012 do CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária).

2.4. Coleta e preparo das amostras teciduais

Após a constatação do óbito, amostras de fezes e conteúdo do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) e grosso (cólon ascendente) foram coletadas, identificadas, acondicionadas em gelo e enviadas ao laboratório para análises coproparasitológicas.

Fragmentos dos tecidos intestinais foram coletados (0,5 a 1 cm) e fixados em solução formalina tamponada a 10% (tampão fosfato 0,01M) por 24 horas. Após os tecidos foram lavados com álcool 70% e desidratados através de passagens

sucessivas em etanol 70%, 80%, 90% e 100%. Posteriormente, realizou-se a diafanização do tecido, a impregnação com parafina e a formação dos blocos. Em seguida os blocos foram congelados a -20°C e então submetidos à secção de cortes em micrótomo (5 µm) para montagem das lâminas histológicas.

2.5 Histoquímica

As lâminas com cortes histológicos foram submetidas à técnica padrão de histologia e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para estudo histopatológico. Por essa técnica a presença das amastigotas de *L. infantum* foi avaliada sob um microscópio óptico, em três secções de cada tecido intestinal.

2.6 Imunoistoquímica

Para identificação das formas amastigotas de *L. infantum* nos tecidos por meio da imunoistoquímica, adotou-se a técnica de Tafuri et al. (2004) com algumas modificações feitas por Queiroz et al. (2011). As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas em peróxido de hidrogênio a 30% (Fluka Chemie AG CH-9470 Buchs) para bloquear a atividade da peroxidase endógena, seguindo-se à incubação com soro normal de cabra (diluição 1:50) para bloquear as reações inespecíficas da imunoglobulina com o tecido. O soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *L. infantum* (diagnosticado pelo ELISA e RIFI; com título de 1:2560), foi usado como o anticorpo primário. O anticorpo secundário foi o anti-IgG de coelho biotinilado produzido em cabra (BA-1000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) (reação imunológica cruzada com IgG de cães). Após três lavagens adequadas em tampão fosfato 0,01M (pH = 7,4) os tecidos foram incubados com o complexo “Avidin-Biotin Peroxidase” (Vectastain ABC Kit PK 6200; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) que serviu para detecção da reação imunológica. Novamente os tecidos foram lavados e então adicionados a eles o substrato cromógeno específico para peroxidase (Nova REDTM substrate Kit SK-4800; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Após a reação e coloração

das amastigotas, os tecidos foram lavados, contra corados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montadas com lamínulas em balsamo do Canadá.

2.7 Grupos experimentais

Os cães foram divididos em três grupos, conforme descrito no capítulo 2, item 1.11 deste trabalho, onde: grupo 1 (G1): cães com LVC e parasitados no intestino com amastigotas de *L. infantum* (n = 8); grupo 2 (G2): cães com LVC porém, sem a presença do parasita *L. infantum* no intestino (n = 9); e o grupo 3 (G3): cães negativos para LVC (n = 3, grupo controle). A identificação das amastigotas de *L. infantum* foi de acordo com as técnicas de imunoistoquímica e histoquímica.

2.8 Determinação da positividade e das regiões analisadas

Cada tecido analisado foi considerado positivo quando as formas amastigotas de *L. infantum* foram visualizadas extra ou intracelularmente, em macrófagos, pela coloração histoquímica (H&E), mas principalmente pela coloração imune específica (na cor marron avermelhada) em pelo menos uma secção de tecido, após o exame de três secções de tecido por segmento intestinal (duodeno, jejuno, íleo e cólon) de cada animal sob um microscópio óptico (lentes objetivas de 40x e/ou 100x).

As regiões analisadas microscopicamente foram a lâmina própria (vilosidades e as criptas), submucosa e as túnicas musculares (túnica circular interna e túnica longitudinal externa) de cada secção da parede intestinal, tanto do intestino delgado como do grosso. Os valores individuais para as criptas e vilosidades foram combinados para criar uma Unidade Vilo/Cripta (UVC), em conformidade com o método de Miller; Jarrett (1971).

2.9 Escores das variáveis

As variáveis analisadas foram: intensidade parasitária por *L. infantum* nos intestinos, sinais clínicos, escore corporal, coloração das mucosas (ocular, bucal e genital) e alterações estruturais macro e microscópicas da mucosa intestinal.

Os cães foram considerados controles negativos (G3), quando negativos para LVC e sem qualquer sinal clínico. Os cães sintomáticos e positivos para LVC dos grupos G1 e G2 foram utilizados para analisar fatores ou variáveis relacionados à LVC. Dessa forma, para a análise estatística de comparação e correlação, essas variáveis receberam pontuações ou escores (1 a 4) de acordo com os valores do menor ao maior grau de comprometimento para cada variável analisada.

As variáveis foram analisadas segundo parâmetros listados abaixo:

Variável - **Intensidade Parasitária (SIP)**: baseada na positividade dos macrófagos contendo as formas amastigotas identificadas de acordo com a imunoistoquímica, observando-se pelo menos 100 campos visuais em aumento microscópico de 40 vezes. A intensidade parasitária foi determinada pelo número de células infectadas pelos parasitas no duodeno, jejuno, íleo e cólon, onde: lâminas sem amastigota ou célula positiva foram consideradas (negativas); levemente parasitadas com 1-50 células (escore 1 +); medianamente parasitadas, com 51-100 células (escore 2 ++); intensamente parasitadas, com 101-200 células, (escore 3 +++) e muito intensamente parasitadas, ou seja, acima de 201 células, (escore 4; ++++). Para a contagem de células, o observador conhecia as formas do parasita, bem como cada região intestinal, ou seja, mucosa, submucosa e muscular.

Variável - **Sinais Clínicos (SSC)**: cães assintomáticos (escore 1); cães com até três sinais clínicos da LVC (escore 2); de quatro a seis sinais clínicos (escore 3); mais que seis sinais clínicos (escore 4).

Variável - **Escore Corporal (SCo)**: cães com massa corpórea normal, (escore 1); abaixo da faixa aceitável para o esperado da sua massa, ou levemente magro (escore 2); magreza aparente, com visualização das vértebras (escore 3); animal caquético, apatia, lentidão dos movimentos (escore 4).

Variável - **Coloração das Mucosas (SCMu)**: foram avaliadas as mucosas ocular, bucal e genital de acordo com suas colorações, portanto, considerou-se: mucosas com colorações róseas (normal), baseado em cães sadios (escore 1); mucosas pouco coradas (escore 2); mucosas pálidas (escore 3); mucosas bastante pálidas, perláceas e/ou até mesmo em processo de isquemia grave (escore 4).

Variável - **Alteração Macroscópica do Intestino (SAMa)**: mucosa normal, sem alteração aparente (escore 1); alteração leve, como a presença de hemorragia

em pontos dispersos do intestino delgado e grosso (escore 2); alteração moderada, como a presença de hemorragia pontual ao longo do intestino e presença do aumento de muco (escore 3); alteração intensa, epitélio destruído, sem diferenciação do conteúdo intestinal nas diferentes porções do intestino, diarreia e as vezes fezes sanguinolentas, e, grande quantidade de muco (escore 4).

Variável - ***Alteração Microscópica do Intestino (SAMI)***: por meio de lâminas histológicas, coradas por H&E, os tecidos foram visualizados em microscópio de luz branca e analisados histologicamente de acordo com as alterações estruturais microscópicas observadas na parede intestinal da seguinte maneira: mucosa normal, sem alteração estrutural (escore 1); alteração leve, como epitélio normal, leve edema e congestão na mucosa e aumento leve de células caliciformes (escore 2); alteração moderada, onde o epitélio apresentou pequena ruptura ou desestruturação na ponta do vilô, moderado edema, congestão e hemorragia e com espessamento da lâmina própria do vilô e da cripta, além da hipertrofia das placas de *Peyer* (escore 3); alteração intensa, ampla destruição da camada epitelial das vilosidades, edema, congestão e hemorragias evidentes, achatamento dos vilos (atrofia), espessamento da mucosa e submucosa, presença de granulomas e/ou pielogranulomas e hipertrofia das placas de *Peyer* (escore 4).

2.10 Delineamento estatístico

A pontuação das variáveis (SIP, SSC, SCo, SMu, SAMa e SAMi) analisadas neste trabalho foi submetida à análise de comparação pelo sistema computacional SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., 1999). O teste estatístico eleito para comparação das variáveis nos três grupos de animais foi o Kruskal-wallis. A correlação entre as variáveis dos cães do grupo 1 (G1) foram analisadas pelo teste de correlação de Spearman. Em ambos os testes respeitou-se o intervalo de confiança de 95%, onde valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente. Todas as análises foram geradas no programa R, versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

O teste de Spearman variou de 1 a -1, onde os valores obtidos mais próximos de 1 indicaram excelente correlação, quer dizer, as variáveis se correlacionaram

positivamente e, quanto mais próximos de -1, indicavam a correlação inversa, ou seja, se uma variável aumentava a outra diminuía, e quando obteve-se valores 0 ou muito próximo, entendeu-se que as variáveis não dependiam linearmente uma da outra.

3 RESULTADOS

3.1 Intensidade parasitária

Dos 20 cães utilizados para este estudo, 15% (3/20) eram sorologicamente e parasitologicamente negativos para LVC e foram agrupados no grupo controle, designados como grupo 3 (G3). Já 85% (17/20) dos cães tinham e eram sintomático para LVC. Pela análise histoquímica e imunoistoquímica, 45% (9/20) dos cães infectados não tinham qualquer forma amastigota de *L. infantum* em seus tecidos intestinais e foram classificados como grupo G2, mas 40% (8/20) deles apresentavam formas amastigotas em pelo menos uma porção do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) e, portanto classificados como grupo G1 (Tabela 03).

Com relação à intensidade parasitária (Tabela 03) verificou-se que a mucosa, ou seja, a unidade viloso/crípta (UVC) do duodeno, jejuno, íleo e cólon dos animais 1, 2 e 4 do G1, foi o local mais intensamente infectado, com carga parasitária atingindo escore máximo 04 (+ + + +). Em seguida, a submucosa (SM) de todos os segmentos do intestino desses animais estava infectada com quantidades moderadas de parasitas, escore 02 (+ +) na maioria dos casos. Já as camadas musculares, circular (CM) ou longitudinal (LM) foram as que apresentaram menor número de parasitas, escore 01 (+), mas apenas no intestino delgado, visualizados tanto no duodeno, como no jejuno e no íleo. Cabe ressaltar que esse foi o primeiro relato de *Leishmania* spp. na camada muscular do intestino delgado de cães.

Ainda de acordo com a Tabela 3, verificou-se que 50% (4/8) dos animais tinham amastigotas deste protozoário no duodeno e no jejuno, em pelo menos uma região da parede intestinal (UVC, SB, CM ou LM) e, nessas duas porções intestinais, a maior concentração parasitária foi detectada na mucosa (UVC), com escore variando de 3 a 4 (+++ a ++++) em pelo menos três cães (cães 1, 2, e 4). No íleo, foi

registrada a presença do parasito em 62,5% (5/8) dos cães e a maior concentração parasitária também estava na mucosa. Com relação ao cólon, 75% (6/8) dos cães examinados encontravam-se positivos e com intensidades parasitárias variando de intensa (escore 3; +++) a muito intensa (escore 4; ++++). Nessa porção do intestino (cólon), as amastigotas foram observadas dispostas extracelularmente ou no interior de macrófagos, preferencialmente na lâmina própria da mucosa, próximo à região basal (cripta). As amastigotas foram observadas também entre as células epiteliais das pontas dos vilos, em algumas lâminas, mas em intensidade leve. No entanto, em nenhum animal examinado, as formas amastigotas de *L. infantum* foram observadas nas camadas musculares do cólon.

3.2 Alterações microscópicas na mucosa intestinal com *L. infantum*

A identificação das alterações microscópicas da mucosa intestinal foi realizada por investigação histopatológica dos animais do grupo G1 (n = 08), onde se identificou amastigotas intestinais de *L. infantum*. Nesse grupo, destacou-se que 100% dos animais eram sintomáticos para LVC. Nesses animais, os macrófagos contendo amastigotas de *L. infantum* foram visualizados por toda a extensão da parede intestinal, incluindo a lâmina própria da mucosa, formada pelas unidades de vilo-cripta (UVC), a submucosa (SM) e a muscular (Mu). Na mucosa do intestino delgado, as amastigotas de *L. infantum* foram registradas preferencialmente na ponta dos vilos no interior de abundantes macrófagos hipertróficos. Nas figuras 2 A e B esses macrófagos infectados são observados na ponta do vilo do íleo do cão (01) identificados por imunoistoquímica (cor marrom avermelhado). Em menor número, as amastigotas também foram vistas na submucosa e na musculatura. Nas figuras 2 C e D os parasitas imunomarcados são observados na camada de musculatura lisa circular interna (CM) e na longitudinal externa (LM) do jejuno, entre as fibras musculares e no plexo nervoso mioentérico. Além disso, observou-se os parasitas até no interior das placas de *Peyer* (aglomerados linfonodulares), como pode ser visto nas Figuras 2 E e F.

No duodeno, 50% dos cães apresentavam amastigotas intestinais, e havia irregularidades na mucosa onde também era o local com maior concentração de

parasitas. Destaque foi dado ao cão (01), com escore 4 (++++), de intensidade parasitária (Tabela 3), apresentando na ponta do vilo um infiltrado mononuclear com predominância do tipo histiolinfoplasmocitário, caracterizando uma enterite, com moderados microvacúolos e edema apical, semelhante a um pólipio linfagiomatoso (Figura 3 A e B). Nessa secção, as células epiteliais colunares altas não foram observadas, principalmente na ponta dos vilos, onde foi observado o desnudamento do epitélio (Figura 3 B). A submucosa do duodeno, apesar de estar levemente parasitada (escore 1, +), apresentava um espessamento, com desorganização das fibras conjuntivas e aumento de vasos sanguíneos (arteríolas). Três cães (37,5%) apresentaram também amastigotas na camada muscular do duodeno, tanto na circular quanto na longitudinal.

No jejuno, assim como no duodeno, 50% dos cães apresentavam amastigotas na parede intestinal, mas com intensidades parasitárias levemente inferiores às do duodeno (Tabela 3). Nesse segmento intestinal, as glândulas de *Brunner* em grande quantidade estavam cercadas por infiltrado celular não só do tipo mononuclear, mas também polimorfonuclear, porém com predominância de macrófagos. No cão 03, as placas de *Peyer* do jejuno e também do duodeno (Figuras 2 E e F) apresentavam-se hipertróficas com grandes folículos secundários, sugerindo atividade sintética de anticorpos, possivelmente sensibilizados pela presença dos parasitas na mucosa intestinal. Embora em menor intensidade (escore 1 a 2, + a ++), alguns cães também se encontravam positivos na submucosa e na muscular do jejuno.

No íleo evidenciaram-se positivo com amastigotas de *L. infantum* em 62,5% dos cães avaliados, mas apenas em dois cães a intensidade parasitária variou de 3 a 4 cruces (Tabela 3). No íleo do cão 01 notou-se, na ponta dos vilos, abundância de parasitas no interior de numerosos macrófagos hipertróficos, ocupando praticamente todo o espaço da lâmina própria evidenciando uma desestruturação morfológica da lâmina própria. Notou-se também que os vasos linfáticos lacteais encontravam-se dilatados, mas sem a presença do parasito no interior dos mesmos. Alguns linfócitos e plasmócitos estavam também presentes, mas a reação inflamatória consistia basicamente por macrófagos (Figuras 3 C e D). Embora a abundância de parasitas tenha sido observada na ponta dos vilos e mesmo logo abaixo da lâmina basal, havia uma integridade física da camada epitelial nesses

locais. Ainda no íleo, observou-se que as extremidades das cápsulas das placas de *Peyer* dos animais infectados apresentavam-se com maior concentração de células linfocitárias nas bordas, como se formassem uma corrente de reforço ao entorno das cápsulas e no interior havia muitos macrófagos.

A descrição histopatológica do intestino grosso, representado pelo cólon ascendente, foi baseada em observações microscópicas de toda a sua parede, ou seja, da mucosa, submucosa e da muscular. Em maior número dos cães (75%), essa porção intestinal também se apresentava com maior carga parasitária (Tabela 3), porém as amastigotas estavam presentes preferencialmente na mucosa, concentrando-se mais da região da cripta, principalmente na base da mesma, com a presença de células mononucleares (macrófagos) infectadas com abundante número de parasitas (Figuras 4 A e B). Na submucosa do cólon observou-se reação inflamatória granulomatosa, representada por células mononucleares tais como linfócitos, plasmócitos, macrófagos, células gigantes hipertrofiadas e parasitas (Figura 4 C, D, E e F). Além disso, observou-se também em alguns pontos nas secções teciduais do cólon positivo, uma descontinuidade da *Muscularis* mucosa, (rompimento) com migração das células inflamatórias mononucleares (linfócitos) e macrófagos infectados com amastigotas da mucosa para a submucosa ou vice-versa (Figuras 04 C e D).

3.3 Outras alterações relevantes

Outras alterações macro e microscópicas consideradas relevantes para esse estudo foram observadas na mucosa intestinal. Como por exemplo: congestão, hemorragias, presença de fezes amolecidas ou liquefeitas no conteúdo intestinal do intestino grosso, reações histiolinfoplasmocitárias (reação HLP) e presença de polimorfonucleares (PMN).

A presença de enterite hemorrágica e diarreia foram observadas em dois cães do G1 (Figura 5). No entanto, nesses animais (cães nº 03 e 05), a intensidade parasitária foi baixa e variou de escore 1 a 2 (+ a ++) respectivamente (Tabela 03). Apenas o íleo do cão 03, o jejuno e o cólon no cão 05 encontravam-se com o parasita. Nos cães (01, 02, 04, 06 e 07) do G1 onde a variável diarreia esteve

ausente a intensidade parasitária foi maior e variou de escore 2 a 4 (++ a ++++) (Tabela 03).

Áreas com hemorragias foram observadas em 30% (6/20) das amostras histológicas examinadas, com maior frequência nos cães do grupo G2 (44,4%; 4/9), seguidos dos cães do G1 (25%; 2/8) (Figura 05). No cão 08 do grupo G1, cujo escore foi 3 (+++) observou-se áreas hemorrágicas que se estendiam das vilosidades e criptas (UVCs) à submucosa e à muscular.

Assim como a hemorragia, os processos de congestão foram registrados em 45% (9/20) dos cães, estando presentes em maior número dos cães do grupo G2 (77,7%; 7/9) do que em cães do grupo G1 (25%; 2/8) (Figura 05).

As reações histiolinfoplasmocitárias foram observadas em 60% (12/20) das amostras, e desse total, 87,5% (7/8) foram encontradas nos cães do grupo G1 e apenas 55,5% (5/9) nos cães do grupo G2 (Figura 05). Nesses dois grupos essas reações foram registradas tanto no intestino delgado como no intestino grosso. Já a hiperplasia dos polimorfonucleares (PMN) foi observada em 50% (10/20) das amostras, e ao contrário das reações histiolinfoplasmocitárias, foi predominante nos cães do grupo G2 (77,7%; 7/9) (Figura 05).

3.4 Comparação e correlação clínica e parasitária

As variáveis comparadas nessa análise como: escore dos sinais clínicos (SSC), escore corporal (SCo), escore da coloração das mucosas (SCMu ocular, bucal e genital), escore das alterações macroscópicas (SAMa do duodeno, jejuno, íleo e cólon) e, escore das alterações microscópicas (SAMi duodeno, jejuno, íleo e cólon), foram pontuadas por meio de cruzes ou escores que variaram de 1 a 4, conforme as condições descritas no item 2.5 deste capítulo. Assim, uma análise comparativa para essas variáveis entre cada grupo de animais (G1, G2 e G3), permitiu observar as diferenças entre animais com LVC com ou sem amastigotas de *L. infantum* no intestino (G1, G2, respectivamente), comparando sempre com o grupo controle (G3).

De acordo com a Tabela 4, observou-se que a grande maioria das variáveis estudadas nos cães do G1 (com amastigotas intestinais) foram estatisticamente

diferentes do G3 (controle), tanto para o intestino delgado, como para o grosso, exceção apenas para a variável SAMa observada no cólon em que não houve diferença significativa entre os três grupos de animais. Outro dado importante a ser comentado, é que a maioria das variáveis dos cães do G2 (sem amastigotas intestinais, mas com LVC) não apresentou diferença significativa quando comparadas com as do G1 e as do G3, exceção apenas para a variável SCo (entre G2 e G3), SCMu ocular e bucal (entre G1 e G2).

Realizando-se uma comparação individual para cada variável testada, a variável sinais clínicos gerais (SSC) da LVC (como problemas cutâneos, hepatoesplenomegalia, hipertrofia de glângios, onicogrifose, diarreia, dentre outros), e a variável coloração da mucosa genital (SCMu genital), ficou evidente que os cães do G1 (positivos para LVC e com amastigotas intestinais) apresentaram-se estatisticamente diferentes dos cães do G3 (controles negativos), mas não do G2 (positivos para LVC, mas livres de amastigotas intestinais). O G2 também não diferiu estatisticamente do grupo G3, significando que o estado clínico geral dos cães independente da classificação dos grupos G1 ou G2 estava mais relacionado com outros fatores da doença, do que propriamente dos parasitas intestinais (Tabela 04). O mesmo não ocorreu, com a coloração das mucosas ocular (SCMu ocular) e bucal (SCMu bucal), pois as mucosas muito pálidas foram observadas somente nos animais do grupo G1, mas não nos do G2 ou do G3.

Os escores referentes às alterações macroscópicas intestinais (SAMa), variaram de 1 a 2, na maioria dos casos, significando mucosas intestinais aparentemente normais ou levemente lesionadas nos animais do grupo G1, mesmo estando infectados com as formas amastigotas, enquanto os animais do G2 permaneceram com escore inferior a 2 (leve) e do grupo G3 no escore 1, significando aparência macroscópica normal. As alterações macroscópicas observadas (muco, congestão, hemorragia, fezes sanguinolentas e lesões diversas) no intestino delgado do grupo G1, mesmo leves, foram significativas quando se comparou com os cães do grupo G3, mas não com do G2. No cólon, no entanto, não se detectou qualquer alteração macroscópica significativa entre os três grupos estudados, onde o escore permaneceu inferior a 2.

Entretanto, as alterações microscópicas (SAMI) demonstraram diferenças significativas no intestino delgado e grosso quando comparou-se os animais do grupo G1 com os do G3. As lesões microscópicas observadas na parede intestinal dos animais infectados com as amastigotas (G1) variaram de moderadas a graves. Nos animais do G2 variaram de leves a moderadas, porém, as diferenças não foram significativas entre os animais dos dois grupos (Tabela 04). Já os cães do grupo G3, apresentavam mucosa normal, sem alteração estrutural (escore 1) diferindo estatisticamente para todos os segmentos do trato intestinal analisado (duodeno, jejuno, íleo e cólon) do grupo G1, mas não do G2. Dessa maneira, as alterações estruturais microscópicas observadas nos animais infectados com amastigotas intestinais apresentaram um padrão significativamente diferente ao nível de 5%, no grupo controle G3, demonstrando que os parasitas presentes no G1 foram responsáveis por parte das alterações microscópicas na mucosa intestinal.

O estudo de correlação comparativa entre as variáveis foi realizado somente com os animais do G1 por estarem estes infectados com as formas amastigotas de *L. infantum* no trato intestinal e, utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Spearman para observar a correlação entre as variáveis (Tabela 5).

Pela Tabela 5, verificou-se que as intensidades parasitárias no trato intestinal (SIP) correlacionaram-se linearmente de forma positiva e significativa a 5% com as alterações microscópicas na mucosa (SAMI), tanto no intestino delgado ($p = 0,81$), como no intestino grosso ($p = 0,78$), significando que à medida que se aumentava o número de parasitas no intestino, as lesões na mucosa se intensificavam (Tabela 5 e Figura 6 A). Separadamente, os segmentos íleo e cólon ($p = 0,86$ e $p = 0,78$) apresentaram melhor correlação para essas variáveis (SIP x SAMI), ambos foram estatisticamente significativos ao nível de 1% e 5%, respectivamente (Figuras 6 D e E).

Continuando com a análise de correlação entre os sinais clínicos gerais e a intensidade parasitária (SSC x SIP), verificou-se essa correlação positiva e significativa ($p = 0,73$) apenas no intestino delgado (Tabela 05), tendo como destaque o jejuno e o íleo com valores $p = 0,71$ e $p = 0,75$, respectivamente (Figuras 6 C e D). Já no intestino grosso (cólon), ambas variáveis não estavam relacionadas (Tabela 05, Figura 6 E).

Os sinais clínicos gerais (SSC) e as alterações microscópicas da mucosa intestinal (SAMI) também apresentaram correlação positiva nos intestinos delgado e grosso, cujos respectivos valores encontrados foram ($p = 0,83$ e $p = 0,72$) todos significativos ao nível de 5% (Tabela 05, Figura 6 A), destacando-se o íleo ($p = 0,83$) e o cólon ($p = 0,72$) (Figura 6 D e E). Todavia, para o duodeno e jejuno não houve correlação ($p = 0,36$) na análise dessas duas variáveis (SSC x SAMI) (Figuras 5 B e C).

Ainda na Tabela 5, pode-se observar que as colorações da mucosa ocular e bucal (SCMu oc e SCMu bu) estavam intimamente correlacionadas ($p = 1$) e ambas variáveis apresentaram correlação positiva com a massa corpórea (SCo; $p = 0,82$), significativa a 5% ($p \leq 0,05$). No entanto, não houve correlação entre a intensidade parasitária (SIP) com a coloração das mucosas ocular e bucal (SCMu oc, bu; $p = 0,39$), entre a massa corporal (SIP x SCo; $p = 0,16$) e as alterações macroscópicas da mucosa no intestino grosso (SIP x SAMa; $p = -0,41$).

Já a coloração da mucosa genital (SCMu ge) não apresentou valores no teste de Spearman, pois não houve diferença significativa nos resultados de comparação entre os três grupos estudados conforme pode ser observado na Tabela 04.

4 DISCUSSÃO

4.1. Intensidade parasitária e histopatologia

Pela análise histopatológica e imunoistoquímica realizada nos tecidos dos cães com LVC, ficou evidente que 40,0% (8/20) deles apresentavam amastigotas de *L. infantum* extra e intracitoplasmáticas em macrófagos presentes nas vilosidades, criptas, submucosa e camadas musculares lisas circulares e longitudinais dos intestinos delgado e grosso. A coloração imunoistoquímica já foi relatada como mais sensível do que a histoquímica para a detecção de leishmânias em vários tecidos (FERRER et al., 1991; SILVA et al., 2002; ASSIS et al., 2010), fato esse confirmado pelos resultados deste estudo, onde mesmo em pequeno número, as amastigotas imunomarcadas intra ou extracelulares eram mais facilmente reconhecíveis.

Em concordância com essa pesquisa, formas amastigotas de *Leishmania* spp. intramacrofágica foram observadas no trabalho de Anderson et al. (1980) na lâmina própria e submucosa de estômago, duodeno, jejuno, íleo e cólon de um cão com LVC. Posteriormente, os parasitas foram também detectados em cães experimentalmente (KEENAN et al., 1984a; KEENAN et al., 1984b; CHIAPELLA et al., 1986) e naturalmente infectados (FERRER et al., 1991; SILVA et al., 2002; ADAMAMA-MORAITOU et al., 2007; PINTO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2013).

Na presente pesquisa, no intestino delgado, macrófagos com amastigotas de *L. infantum* foram encontrados preferencialmente na lâmina própria (mucosa), na maioria dos casos, de forma abundante nas pontas das vilosidades, e em alguns pontos logo abaixo da lâmina basal da camada de células cilíndricas epiteliais. No intestino grosso (cólon), os parasitas se concentraram na lâmina própria em torno das criptas. De acordo com Keenan et al. (1984 a, b), Gonzalez et al. (1990), Pinto et al. (2011) e Figueiredo et al. (2013) as formas amastigotas eram muito mais evidentes no intestino grosso do que no intestino delgado, predominantemente localizadas na mucosa. Em concordância com os autores acima, o intestino grosso (cólon) também foi a região intestinal com maior frequência de animais infectados (75%) e com intensidades parasitárias variando de 3 (+++) a 4 (+++++) na maioria dos cães estudados. Porém na presente pesquisa, além do cólon, os parasitas também foram detectados em grande quantidade no intestino delgado, com intensidades semelhantes às observadas no cólon, principalmente em três desses animais (cães 01, 02 e 04), tanto no duodeno, como no jejuno e o íleo, sendo muito significativo neste último. Este fato demonstra que, quando os animais estão muito comprometidos clinicamente, todo o trato intestinal pode estar infectado com esses parasitas. Além disso, foi relatada aqui pela primeira vez, a presença dos parasitas nas camadas de músculo liso circular e longitudinal em 37,5% (3/8) dos cães do G1, embora somente no intestino delgado.

No intestino grosso (cólon), as amastigotas de *L. infantum* foram vistas em macrófagos hipertróficos na lâmina própria das criptas e na submucosa associadas a um infiltrado inflamatório mononuclear crônico, como previamente relatado por Ferrer et al. (1991), Adamama-Moraitou et al. (2007) e Pinto et al. (2011). Linfócitos, macrófagos, células gigantes e epitelióides como descritos por Pinto et al. (2011)

também foram detectados nesta pesquisa. Na submucosa, uma leve reação inflamatória granulomatosa crônica, representada particularmente por macrófagos infectados também estava presente no cólon semelhante ao encontrado nos estudos de Adamama-Moraitou et al. (2007) que relataram esse padrão inflamatório granulomatoso como a característica histológica mais comum na mucosa do cólon.

No duodeno observou-se o desnudamento do epitélio da ponta do vilo, associado ao grave infiltrado mononuclear inflamatório e à intensa infecção parasitária observada em um animal, com predomínio da resposta inflamatória caracterizada principalmente por macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Irregularidades no tamanho dos vilos também foram observadas no duodeno de 62,5% (5/8) dos cães do G1. Já no jejuno destacou-se a hipertrofia dos aglomerados linfóides isolados (placas de *Peyer*) provavelmente sensibilizados pela presença do parasita e, no íleo ficou evidente a intensa desestruturação morfológica da lâmina própria das vilosidades e a atrofia das criptas associada com abundante parasitismo.

No cólon, a desorganização predominante foi visualizada na base da cripta, ao nível da *muscularis* mucosa que divide a submucosa das células basais da cripta e a formação granulomatosa na submucosa. Embora com intenso parasitismo, a integridade da camada epitelial que reveste toda a mucosa foi mantida na maioria dos casos nesse estudo. Dados semelhantes foram relatados por Pinto et al. (2011) em cães assintomáticos e sintomáticos com LVC, não observando graves lesões intestinais, como erosão epitelial ou destruição das células na mucosa. A elevada carga parasitária evidente em toda mucosa do trato gastrintestinal, mas com apenas leves alterações patológicas, levou Pinto et al. (2011) sugerir que o protozoário *L. infantum* poderia desenvolver uma resposta imunorreguladora intestinal (tolerância imunológica) e ganhar vantagem para sobreviver na parede intestinal, fato também sugerido na presente pesquisa, mas que deve ser estudado posteriormente em outras pesquisas.

De acordo com Ghinato et al. (2011), a alteração histopatológica mais frequente em seus estudos foi a reação inflamatória linfohistioplasmocitária, com predomínio maior no íleo (97,2%) e ceco (91,7%), seguidos pelo duodeno (88,9%), jejuno e cólon (86,1%) e, por último, o reto (72,2%). Em nossos estudos a reação inflamatória linfohistioplasmocitária foi observada em 87,5% (7/8) dos cães com

amastigotas de *L. infantum* nos intestinos delgado e grosso (G1). Contudo, além desse padrão inflamatório, outras alterações também foram observadas, quando comparadas ao grupo controle, como, por exemplo, a hiperplasia e hipertrofia de macrófagos, a presença de placas de *Peyer* hipertrofiadas e com formas amastigotas em seu interior, vasos lacteais dilatados na lâmina própria dos vilos, principalmente no íleo, além da desestruturação morfológica do tecido e alterações pouco recorrentes como edema apical, semelhante a um pólipio linfagiomatoso no duodeno. Estas últimas observações foram exclusivas da presente pesquisa. Além disso, observou-se aumentado número de PMN (neutrófilos e eosinófilos) circundando as criptas, em três cães do G1 cuja intensidade parasitária variou de escore 1 a 3 (+ a +++), embora a presença predominante dos PMN fosse relatada em animais com ausência de amastigotas (G2). Silva et al. (2002) acrescentaram ainda formações polipóides caracterizadas pelo alargamento das vilosidades intestinais como uma alteração também observada na mucosa intestinal de cães acometidos com LVC.

4.2. Comparação e correlação clínica e parasitária

No estudo de correlação clínica e parasitária, algumas variáveis relevantes da LVC foram avaliadas e comparadas com o parasitismo intestinal dos animais e resultados interessantes foram obtidos.

A maioria das variáveis analisadas do grupo 1 (G1) não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao grupo 2 (G2), exceção apenas para a variável coloração da mucosa ocular e bucal (SCMu), sugerindo ser a palidez das mucosas um indicador de leishmaniose intestinal, podendo o parasita causar disfunções do sistema gastrointestinal e acarretar anemia. Entretanto, o G1 diferiu do G3 em quase todas as variáveis, com exceção apenas da alteração estrutural macroscópica do cólon, que não foi diferente em nenhum grupo. O grupo G2 por outro lado, permaneceu numa categoria intermediária, diferindo apenas na variável escore corporal do G3, demonstrando que o emagrecimento progressivo observado em cães do G2 pode ser mais em decorrência de fatores clínicos gerais e não necessariamente da presença dos parasitas na mucosa intestinal, embora isso

possa ser um agravante da doença. Sendo assim, os parasitas presentes no G1, mas ausentes no G2, além da ausência de diferenças significativas entre G2 e G3, na maioria dos casos, sugerem que os cães do G1 e do G2 que tem LVC podem estar imunodeprimidos pela doença e susceptíveis a outros agentes infecciosos intestinais em adição ao comprometimento de vários órgãos, já que a LVC por ser uma doença sistêmica crônica, compromete o sistema imunológico, podendo levar o animal à morte (GONTIJO; MELO, 2004).

Dos animais com LVC, todos eram sintomáticos e os sinais clínicos mais evidentes foram o crescimento anormal das unhas (65%), emagrecimento (60%), mucosas pálidas (30%) alterações cutâneas gerais, incluindo a alopecia (45%) e infartamento ganglionar (45%). O alongamento anormal das unhas pode ser explicado pelo estímulo da matriz ungueal pelo próprio parasita (LESTOQUARD; DONATIEN, 1938). Já a alopecia, pode ser explicada pela ação direta do parasito sobre o folículo piloso ou por um distúrbio no metabolismo do ácido pantotênico, decorrente de graves lesões hepáticas, ou ainda, por deposição de imunocomplexos na membrana basal da pele, induzindo a um processo autoimune que desencadeia a queda de pêlos (HOMMEL, 1978), embora acredita-se que os maus cuidados com o animal, assim como as condições precárias de habitação possam intensificar a condição da alopecia.

No presente trabalho, os sinais clínicos (SSC) apresentaram correlação significativa positiva ($p = 0,73$) com a intensidade parasitária (SIP) observada no intestino delgado, porém ausente do intestino grosso. No entanto, diferentemente desse resultado, Marzochi et al. (1985) não verificaram qualquer correlação positiva entre os sinais clínicos e a presença o parasita em vísceras ou peles dos cães com LVC. Similarmente, Figueiredo et al. (2013) alegaram não encontrar correlação entre os sinais clínicos e as alterações patológicas, imunológicas e parasitológicas no trato gastrointestinal de cães com LVC alegando que segmentos distintos do trato gastrointestinal apresentam diferentes respostas imunológicas e parasitológicas frente aos parasitas.

Os cães do grupo G1 apresentavam mucosas (SCMu oc e SCMu bu) em geral pálidas, com escore superior a 3, porém não houve correlação significativa com a intensidade parasitária (SIP). Mas encontrou-se forte correlação ($p \leq 0,01$)

entre as colorações das mucosas oculares e bucal (SCMu oc e SCMu bu) e o escore corporal (SCo), demonstrando que a condição corporal do animal estava refletido no padrão de cor das mucosas, em geral pouco coradas. Estes dados sugerem que as disfunções sistêmicas causadas pelo parasita podem comprometer a homeostasia dos órgãos. De acordo com Silva et al. (2010) e Genaro (1997), a palidez das mucosas pode ser consequência de anemia e, pode refletir o comprometimento da reposição celular da medula óssea.

O emagrecimento, geralmente é um dos sinais clínicos mais observados nos animais suspeitos ou portadores de LVC (SILVA et al., 2010) e a perda da massa corpórea dos animais pode sinalizar o estado de cronicidade da doença e ser explicado pelo processo de infiltração parasitária que compromete o sistema digestório (CATARSINI, 1981; COUTINHO et al., 2005). No entanto, para este estudo, não foi observado correlação positiva entre a intensidade parasitária (SIP) dos intestinos com escore corporal (SCo). Uma explicação é que a média dos escores para a intensidade parasitária dos cães do G1, incluindo todas as porções intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) foi baixa (escore = 1,6), ou seja, animais levemente infectados, enquanto a média geral do escore corporal desses animais foi alta (escore = 3,3; magros). Outro dado relevante é que os cães do G2 (positivos para LVC, mas sem parasitas intestinais) também apresentaram escore corporal médio elevado (escore 3). Com base nessas informações, sugere-se mais uma vez que a presença do parasita no intestino, não é o fator determinante da perda inicial de peso dos animais, mas pode agravar a condição clínica à medida que a doença avança, pois o parasito foi a causa de alterações microscópicas na mucosa intestinal, diretamente relacionadas com a condição clínica do animal e isso pode afetar a digestão alimentar e a perda de peso.

Comprovando as informações acima, constatou-se que as intensidades parasitárias (SIP) dos intestinos delgado e grosso mostraram forte correlação com as alterações microscópicas (SAMi) desses intestinos, indicando que os parasitas foram os responsáveis pelas alterações histopatológicas desse órgão. Concordantemente, Adamama-Moraitou et al. (2007) também verificaram correlação, mas apenas no intestino grosso, onde o parasitismo no cólon estava associado também à patogênese intestinal, observado por meio das lesões macroscópicas.

Além disso, a variável SAMi, tanto do intestino delgado como do intestino grosso, estava correlacionada com os sinais clínicos gerais (SSC) dos cães já descritos anteriormente. Essa interação pode ser predictiva de que os cães com escore elevado para sinais clínicos sistêmicos, ou seja, em estado avançado da doença, podem também apresentar lesões intestinais provocadas pelos parasitas intensificando o quadro clínico geral dos animais, levando-os à caquexia. A gravidade do infiltrado inflamatório, que neste estudo compõe as análises das alterações microscópicas da mucosa intestinal, também já foi associada em outros estudos, com a carga parasitária, espécies de parasita e com o estado imunológico do hospedeiro (SANTOS; BADARÓ; FREITAS, 2004), além de diferir de um grupo a outro de animais em virtude da variabilidade racial ou individual dos mesmos.

Além de ser um órgão de digestão e absorção o intestino assume um importante papel imunológico por sua participação na defesa contra as agressões do meio externo e, a função imune desse órgão depende de três componentes: a barreira intestinal, o sistema imune (tecido linfoide associado ao intestino – GALT, plasmócitos, linfócitos, imunoglobulinas) e a microflora (GUARNER, 2006). Logo, associando o efeito da nutrição sobre o sistema imune intestinal, Fonseca; Costa (2010) levantaram diversas interferências, onde o tipo de nutrição dos animais afetam significativamente os mecanismos imunes do intestino, desse modo, os diferentes cuidados alimentares, vacinas e vermífugos que os cães deste experimento recebiam de seus proprietários antes de serem submetidos à eutanásia, podem explicar o comprometimento do escore corporal, mesmo nos casos dos animais sem formas amastigotas de *L. infantum* intestinal.

Em outra análise relacionada com as alterações estruturais microscópicas da mucosa intestinal dos 20 cães avaliados nessa pesquisa, foram observadas mucosas hemorrágicas e congestionadas em 30% e 45%, respectivamente e, em geral, ocorreram com maior frequência na ponta dos vilos. Embora dois cães do grupo G1 tenham apresentado congestão intensa nas vilosidades e submucosa do íleo e áreas hemorrágicas nas vilosidades do cólon, essas duas alterações foram mais frequentes em cães sem a presença do parasito no intestino, ou seja, do grupo G2. Apesar de não ser com a mesma intensidade, Ghinato et al. (2011) também descreveram hiperemia, hemorragia e congestão em mais de 50% de suas

amostras de tecidos gastrintestinais de cães com parasitas nesse órgão, sendo o cólon o órgão com maior prevalência (80,6%). Da mesma forma, Figueiredo et al. (2013) ao avaliarem 24 cães com LVC, e que apresentavam ou não o parasito no intestino, relataram em suas análises histológicas semi-quantitativas a presença de hemorragia (43% e 34%); congestão (82% e 65%); hiperplasia de macrófagos (78% e 86%); plasmocitose (73% e 78%) e, níveis elevados de células mononucleares (100% e 100%), respectivamente, para o jejuno e cólon.

Ainda pela presente pesquisa, conforme observado nas análises histopatológicas dos cães do grupo G2, esses animais apresentavam maior número de áreas hemorrágicas, congestão e uma resposta celular intestinal marcada pelo predomínio de PMN. Já os cães do G1, cuja presença do parasito *L. infantum* se fazia presente no intestino, observou-se uma resposta celular marcada por grande número de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (reações histiolinfoplasmocitária). As reações histiolinfoplasmocitárias, embora também observadas em alguns cães do G2, apresentavam muitas semelhanças com os cães do G1 quanto aos sinais clínicos.

Cães com formas amastigotas intestinais de *L. infantum* (grupo G1) apresentaram ausência ou presença de alterações macroscópicas, mas em intensidades leves (SAMa), na mucosa do intestino delgado. No cólon, no entanto, não se detectou qualquer alteração macroscópica significativa entre os três grupos estudados, onde o escore permaneceu inferior a 2. Da mesma forma, Ghinato et al. (2011) também relataram não encontrar nenhuma alteração macroscópica no intestino delgado e grosso de cães positivos para esse parasita. Porém, Adamama-Moraitou et al. (2007) relataram lesões microscópicas em biópsias do cólon apenas de cães com *L. infantum*, mas não em tecidos com ausência do parasita. A ausência de correlação dos sinais clínicos sistêmicos (SSC) caracterizando as alterações macroscópicas (SAMa) tanto do intestino delgado e principalmente do intestino grosso ($p = 0,02$) podem ser explicadas pelo fato de que as anormalidades macroscópicas no trato intestinal provocadas pelo parasita nem sempre se correlacionam com a gravidade da doença. No intestino grosso, por exemplo, a correlação foi até negativa ($p = -0,41$) quando analisada com a intensidade parasitária desse órgão, significando que o parasita causou pouco dano na estrutura

morfológica macroscópica do órgão, demonstrando controle regulador da resposta inflamatória e imune do hospedeiro a favor do parasita.

Diarreia crônica do intestino grosso é muito incomum como um sinal clínico primário da leishmaniose canina (SLAPPENDEL, 1988). Porém, Gonzalez et al. (1990) e Ferrer et al. (1991) relataram casos de colite crônica grave e diarreia em cães, naturalmente infectados com *L. infantum*. No entanto, outros autores relataram que a diarreia ocorrida em cães com leishmaniose estava mais associada com outros sinais sistêmicos, incluindo anorexia, emagrecimento, anemia, linfadenopatia e lesões de pele (CHAPMAN; HANSON, 1984), o que levou Ferrer et al. (1991) a questionarem se a diarreia era causada por *Leishmania* spp. ou se era apenas um achado acidental, particularmente se a carga parasitária fosse baixa. Da mesma forma, Adamama-Moraitou et al. (2007) mencionaram que é importante levar em conta os sinais clínicos gerais do animal e as reações inflamatórias causadas por outras infecções, incluindo bactérias ou parasitas (protozoários e helmintos), para um diagnóstico diferencial da leishmaniose intestinal. Em nossos estudos a presença de diarreia foi registrada em apenas dois animais do grupo G1 (cães 03 e 05), porém com intensidades parasitárias muito baixas (+ a ++), e pelas observações microscópicas (SAMi) e macroscópicas (SAMa) da mucosa intestinal, os dois animais apresentavam alterações moderadas (escore 2), sugerindo a fase inicial da infecção por *L. infantum* nesse órgão, por isso é questionável ainda uma possível correlação entre a intensidade parasitária e a diarreia. Mas, é importante mencionar que um dos cães que estava com diarreia sanguinolenta, apesar de apresentar baixa carga parasitária de *L. infantum* havia a predominância de um infiltrado inflamatório polimórfico representado por hiperplasia de eosinófilos e de neutrófilos, sendo indicativo da fase aguda da doença, ao invés da inflamação crônica observada na maioria dos cães sem diarreia, mas com alta intensidade parasitária por *L. infantum*.

5 CONCLUSÕES

- Cães com LVC apresentaram formas amastigotas de *L. infantum* no intestino delgado e grosso, na mucosa, submucosa e na camada muscular, embora com maior predominância na mucosa.
- 47,1% (8/17) dos cães com LVC apresentavam o parasita, com intensidades variando nas diferentes porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e do intestino grosso (cólon).
- O cólon foi o órgão com a maior ocorrência desse parasita.
- Relatou-se aqui a primeira ocorrência de amastigotas de *L. Infantum* na camada muscular, mas apenas do intestino delgado.
- A reação inflamatória na mucosa intestinal dos cães parasitados por formas amastigotas de *L. infantum* foi caracterizada por infiltrado crônico de células mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos (reações histiolinfoplasmocitárias).
- Houve correlação positiva entre a intensidade parasitária com as alterações estruturais histopatológicas indicando que o parasita foi responsável pela alteração da integridade estrutural histológica dos intestinos, principalmente no jejuno e no íleo, mas não no cólon.
- Como o cólon foi o órgão mais frequentemente e intensamente parasitado, as correlações significativas entre as alterações microscópicas na mucosa e a intensidade parasitária, sugerem uma susceptibilidade desse órgão para infecções por *L. Infantum*.
- Não se observou lesões macroscópicas evidentes associadas com a intensidade parasitária

6 REFERENCIAS

- ADLER, S. Leishmania. **Advances in Parasitology**, New York, v. 2, p. 35-96, 1964.
- ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; RALLIS, T. S.; KOYTINAS, A. F.; TONTIS, T. PLEVRAKI, K.; KRITSEPI, M. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: A prospective study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 76, n. 1, p. 53-57, 2007.

ANDERSON, D. C.; BUCKNER, R. G.; GLENN, B. L.; MACVEAN, D. W. Endemic canine leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 17, n. 1, p. 94-96, 1980.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA JUNIOR, A. C. F.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p.18-26, 2010.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORE, J. L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.

CATARSINI, O. Epidemiologia e manifestazione cliniche della leishmaniose del cane. **Revista de Parasitologia**, Goiânia, v. 44, p. 83-87, 1981.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, Barcelona, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CHANG, K. P.; FONG, D.; BRAY, R. S. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: CHANG, K. P.; BRAY, R. S. (Eds.). **Leishmaniasis**. Amsterdam: Elsevier, 1985. 130 p.

CHAPMAN, W.; HANSON, W. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1984.

CHIAPELLA, A. Diagnosis and management of chronic colitis in the dogs and cat. In: KIRK, R. (Ed.). **Current veterinary therapy**. 9. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 896-993.

COSTA, C. A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; MICHALICK, M. S.; MELO, M. N.; COSTA, R. T.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M. MAYRINK, W. Canine visceral Leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Belo Horizonte, v. 21, n. 1, p. 21-25, 1991.

COUTINHO, J. F. V.; XIMENES, M. F. F. M.; JERONIMO, S. M. B.; CARVALHO, G. F.; QUEROZ, P. V. S.; BATISTA, L. M. M.; CARLOTA, F. C. Estudo clínico-laboratorial e histopatológico em cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi*. **Revista Universidade Rural**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 123-124, 2005.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J. A.; DOMINGO, M. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, West Sussex, v. 29, p. 381-388, 1988.

FERRER, L.; JUANOLA, B.; RAMOS, J. A.; RAMIS, A. Chronic colitis dues to *Leishmania* infection in two dogs. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 28, n. 4, p. 342-343, 1991.

FIGUEIREDO, M. M.; AMORIM, I. F. G.; PINTO, A. J. W.; BARBOSA, V. S.; PINHEIRO, L. J.; DEOTI, B.; FARIA, A. M. C.; TAFURI, W, L. Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. **BMC Immunology**, London, v. 14, n. 12, 2013.

FONSECA, F. C. P.; COSTA, C. L. Influência da nutrição sobre o sistema imune intestinal. **Ceres: Nutrição & Saúde**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 3, p. 163-174, 2010.

GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 64-81.

GHINATO, L.; MAIA, F. C. L.; ALVES, L. C.; TAFURI, V. L.; FIGUEIREDO, M. M.; TORRES, S. M.; PIMENTEL, D. S. Alterações estruturais e marcação imunohistoquímica do parasitismo no intestino de cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908). **Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p.9-13, 2011.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, N. M. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Rio de Janeiro, v. 7, n.3, p. 338-349, 2004.

GONZÁLES, J. L.; INSA, F.; NOVOA, C.; PIZARRO, M. Intestinal amyloidosis in hamsters with visceral leishmaniasis. **British Journal of Experimental Pathology**, West Sussex, v. 67, n. 3, p. 353-360, 1986.

GONZÁLES, J. L.; FERMIN, M. L.; GARCIA, P.; ROLLAN, E.; CASTAÑO, M. Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis. Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. **Journal of Veterinary Medicine**, New York, v. 37, n. 5, p. 377-382, 1990.

GUARNER, F. Enteric flora in health and disease. **Digestion**, Basel, v. 73, n. 1, p. 5-12, 2006.

HOMMEL, M. The genus *Leishmania*. Biology of the parasite and clinical aspects. **Bulletin de Institute Pasteur**, Paris, v. 75, p. 5-102, 1978.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H. K.; JOHNSON, A. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 21, p. 74-79, 1984a.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; JOHNSON, A. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. Pathology. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 21, p. 80-86, 1984b.

KUHLS, K.; ALA, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHÖNIAN, G. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 6, e1155, 2011.

LESTOQUARD, F.; DONATIEN, A. Parasitisme de la matrice unguéale dans la leishmaniose générale du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Cachan, v. 31, p. 483-487, 1938.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P.; TOLEDO, L. M.; RANGEL-FILHO, F. B. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MILLER, H. R. P.; JARRET, W. H. F. Immune reactions in mucous membranes: intestinal mast cell response during helminth expulsion in the rat. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 20, n. 3, p. 277-288, 1971.

PINTO, A. J. W.; FIGUEIREDO, M. M.; SILVA, F. L.; MARTINS, T.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Vanloese, v. 53, n. 63, p.1-8, 2011.

PORROZZI, R.; PEREIRA, M. S.; TEVA, A.; VOLPINI, A. C.; PINTO, M. A.; MARCHEVSKY, R. S.; BARBOSA-JUNIOR, A. A.; GRIMALDI-JUNIOR, G. *Leishmania infantum*-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 100, n. 10, p. 926-937, 2006.

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 e associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p.34-40, 2010.

QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NORONHA-JÚNIOR, A. C. F.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Detection of

Leishmania (L.) chagasi in canine skin. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, DF, v. 3, n. 11, p. 13-14, 1997.

ROSS, R. (1) note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, London, v. 2, p. 1261-1401, 1903.

SANTOS, W. L. C.; BADARÓ, J. D. R.; FREITAS, L. A. R. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 92, p. 89-94, 2004.

SILVA, F. L.; TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, W. L. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 340-344, 2002.

SILVA, F. T. S.; SANTOS, J. T.; MARTINS-NETTO, E.; BAVIA, M. E.; NAKATANI, M.; SOUZA, F. D. P.; CARDIM, L. L.; CARNEIRO, D. D. M. T. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Visceral canina no Distrito de Monte Gordo, Cmaçari (BA). **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 34, n. 4, p. 783-795, 2010.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis: A review based on 95 cases in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, Oxfordshire, v. 10, n. 1, p. 1-16, 1988.

STARKE, W. A.; OAKS, J. A. Ileal Mucosal mast cell, eosinophils, and goblet cell populations during *Hymenolepis diminuta* infection of the rat. **Journal of Parasitology**, Lincoln, v. 87, n. 5, p. 1222-1225, 2001.

Statistical Analysis System. SAS online Doc® version 8. Cory SAS institute Inc., 1999.

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.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; 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.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 109, n. 4, p. 1051-1057.

Tabela 3. Resultado da pesquisa de formas amastigotas de *L. infantum* em tecidos intestinais de cães naturalmente infectados. Intensidade parasitária variando de (+) a (+ + + +). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Intensidade parasitária pela presença de amastigotas de <i>Leishmania</i> em tecidos intestinais de cães (G1)					
Cães	Tecidos	Mucosa (vilo/cripta)	Submucosa	Camadas do músculo liso	
				Circular	Longitudinal
01	D	++++	+	N	N
	J	+++	+	+	N
	I	++++	++	+	N
	C	+++	++	N	N
02	D	+++	+	+	+
	J	+++	+	++	+
	I	++	+	++	+
	C	+++	+	N	N
03	D	N	N	N	N
	J	N	N	N	N
	I	+	+	N	N
	C	N	N	N	N
04	D	+++	+	+	N
	J	++	+	N	N
	I	+++	++	N	N
	C	++++	++	N	N
05	D	N	N	N	N
	J	++	+	N	N
	I	N	N	N	N
	C	++	+	N	N
06	D	N	N	N	N
	J	N	N	N	N
	I	N	N	N	N
	C	+++	N	N	N
07	D	++	++	N	N
	J	N	N	N	N
	I	++	++	N	N
	C	N	N	N	N
08	D	N	N	N	N
	J	N	N	N	N
	I	N	N	N	N
	C	+++	N	N	N

D = Duodenum; J = Jejunum; I = Ileum; C = Colon; (+) Positive; (N) Negative.

Tabela 4. Comparação entre as variáveis clínicas, alterações macro e microscópicas da mucosa intestinal em cães do grupo G1 (cães com LVC e com amastigotas de *L. infantum* no intestino), do grupo G2 (cães positivos para LV e sem amastigotas no intestino) e do grupo G3 (cães do grupo controle). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Média dos valores (escore) atribuídos entre os grupos de cães				
Variáveis	Grupos dos cães			Análise estatística
	G1	G2	G3	
SSC	3,25 ^a	2,66 ^{ab}	1,33 ^b	0,008748
SCo	3 ^a	3 ^a	1,33 ^b	0,006429
SCMu ocular	3,5 ^a	1,88 ^b	1 ^b	0,001979
SCMu bucal	3,5 ^a	1,88 ^b	1 ^b	0,001979
SCMu genital	2 ^a	1,33 ^{ab}	1 ^b	0,003477
SAMa duodeno	2 ^a	1,44 ^{ab}	1 ^b	0,006085
SAMa jejuno	2,25 ^a	1,44 ^{ab}	1 ^b	0,00226
SAMa íleo	2,12 ^a	1,77 ^{ab}	1 ^b	0,004401
SAMa cólon	1,87 ^a	1,66 ^a	1 ^a	0,07353
SAMi duodeno	2,75 ^a	2 ^{ab}	1 ^b	0,005496
SAMi jejuno	2,62 ^a	2 ^{ab}	1 ^b	0,01417
SAMi íleo	2,62 ^a	2,3 ^{ab}	1 ^b	0,03425
SAMi cólon	2,87 ^a	1,77 ^{ab}	1 ^b	0,002115

Nota: SSC= escore dos sinais clínicos; SCo= escore corporal; SCMu= escore da coloração da mucosa (ocular, bucal e genital); SAMa= escore das alterações macroscópicas (duodeno, jejuno, íleo e cólon); SAMi= escore das alterações microscópicas (duodeno, jejuno, íleo e cólon). Intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Teste de Kruskal-wallis. Letras minúsculas diferentes entre as colunas representam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 05. Correlação das variáveis clínica e parasitária dos cães com amastigotas de *L. infantum* no intestino (Grupo 1) por meio do coeficiente de correlação linear de Spearman ($P \leq 0,05$). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Análise de Correlação Linear de Spearman dos animais do Grupo 1			
Variáveis	Intestino Delgado	Intestino Grosso	Geral
SIP x SSC	0,73*	0,41	0,46
SIP x SCo	0,16	-0,12	0,16
SIP x SCMu oc	0,57	0,13	0,39
SIP x SCMu bu	0,57	0,13	0,39
SIP x SAMa	0,72*	-0,41	0,56
SIP x SAMi	0,81*	0,78*	0,82*
SAMa x SSC	0,55	0,02	0,42
SAMi x SSC	0,83*	0,72*	0,83*
SAMa x SCo	0	0,58	0,53
SAMi x SCo	0,21	0	0,21
SAMa x SCMu oc	0,33	0,36	0,58
SAMi x SCMu oc	0,6	0,44	0,6
SAMa x SCMu bu	0,33	0,36	0,58
SAMi x SCMu bu	0,6	0,44	0,6
SAMa x SAMi	0,7	-0,37	0,62
Outras Correlações			
Variáveis	Valores p		
SSC x SCo	0,17		
SSC x SCMu oc	0,69		
SSC x SCMu bu	0,69		
SCo x SCMu oc	0,82*		
SCo x SCMu bu	0,82*		
SCMu oc x SCMu bu	1,00**		

Nota: SIP= escore da intensidade parasitária; SSC= escore dos sinais clínicos; SCo= escore corporal; SCMu oc, bu, ge = escore da coloração da mucosa (ocular, bucal e genital); SAMa= escore das alterações macroscópicas; SAMi= escore das alterações microscópicas; NA= análise não avaliada. (**) significativo a 1% ($p \leq 0,01$); (*) significativo a 5% ($p \leq 0,05$).

Figura 2. Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC. A: (íleo) numerosos macrófagos repletos com as formas amastigotas de *Leishmania infantum* na ponta do vilão (objetiva de 40x); B: maior aumento de A, em destaque na ponta das setas pretas as formas amastigotas (objetiva de 100x). C e D: (jejuno) formas amastigotas de *Leishmania* (pequenas setas pretas) observadas na camada de musculatura circular interna, como na longitudinal externa, e os parasitas também são vistos entre as fibras musculares ou no interior do plexo nervoso mioentérico (objetiva de 100x). E: (duodeno) parasitas (setas pretas) em placas de Peyer (nódulos linfáticos isolados) (objetiva de 40x); F: maior aumento de E, na ponta das setas pretas as amastigotas nas placas de Peyer (objetiva de 100x). V= vilão; CM= musculatura circular interna; LM= musculatura longitudinal externa; MP= plexo nervoso mioentérico; M=mucosa; PP=placas de Peyer. Coloração = Imunoistoquímica. Barras = 50 µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

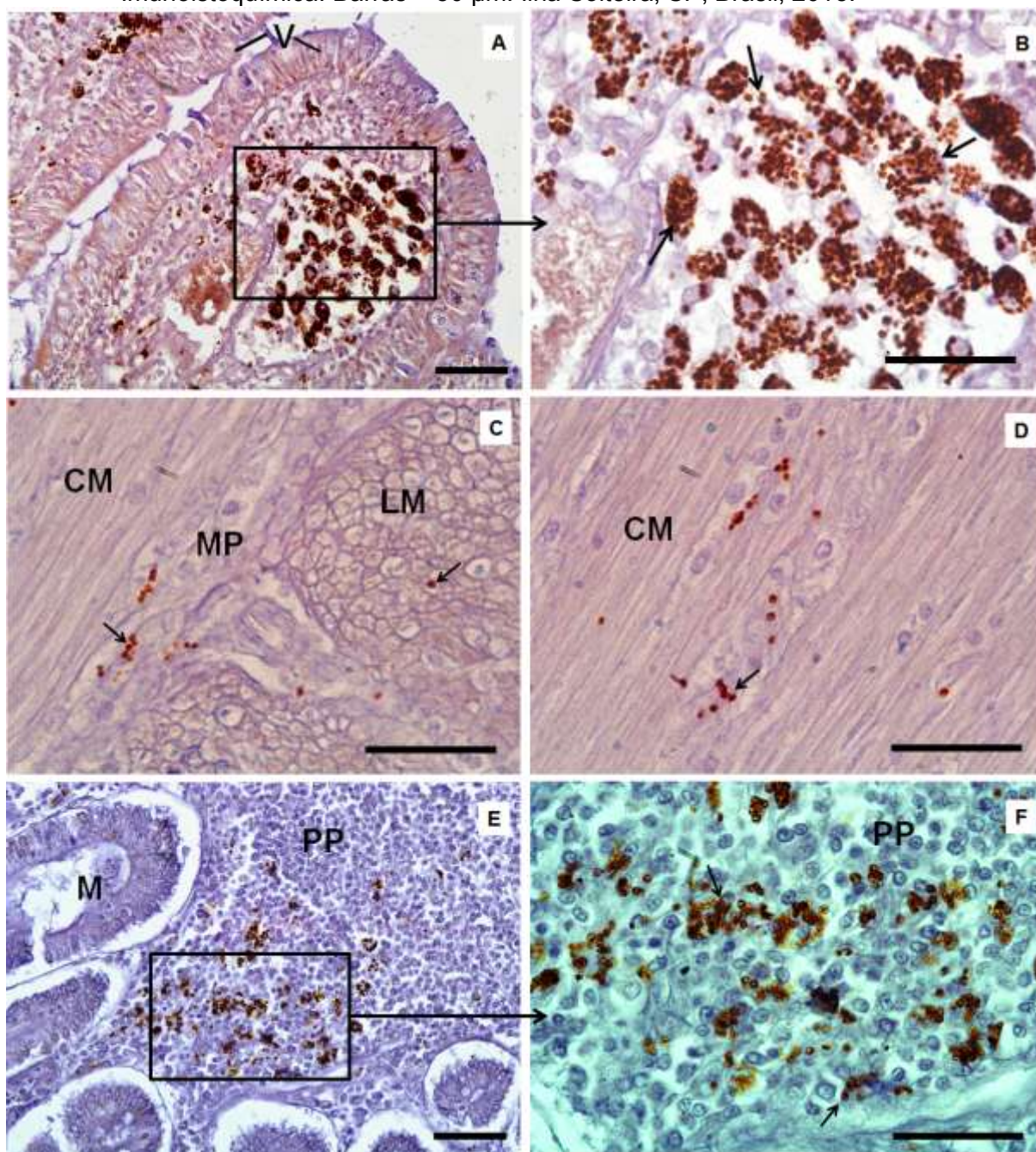


Figura 3. Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC. A: (duodeno) observe na camada epitelial da ponta do vilão, um infiltrado mononuclear, semelhante à histiolifoplasmocitário (seta amarela), caracterizando uma enterite, com moderados microvacúolos e edema apical, semelhante a um pólipio linfangiomatoso (ponta de seta vermelha). Não se observa células cilíndricas altas e o eixo conjuntivo vascular está tomado por infiltrado celular linfocitário (ponta de seta preta) (objetiva 20x). B: (duodeno) desnudamento do epitélio (ponta da seta azul). C: (íleo) ponta do vilão com muitos macrófagos (retângulo preto) infectados com amastigotas *L. infantum* (objetiva 40x). D: maior aumento de C (objetiva 100x), com macrófagos infectados (setas brancas) e linfócitos (setas pretas). Nota-se dilatação dos vasos linfáticos dilatados na ponta da vilosidade. V=vilão; L=vasos linfáticos. Coloração: H&E. Barras = 50 µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

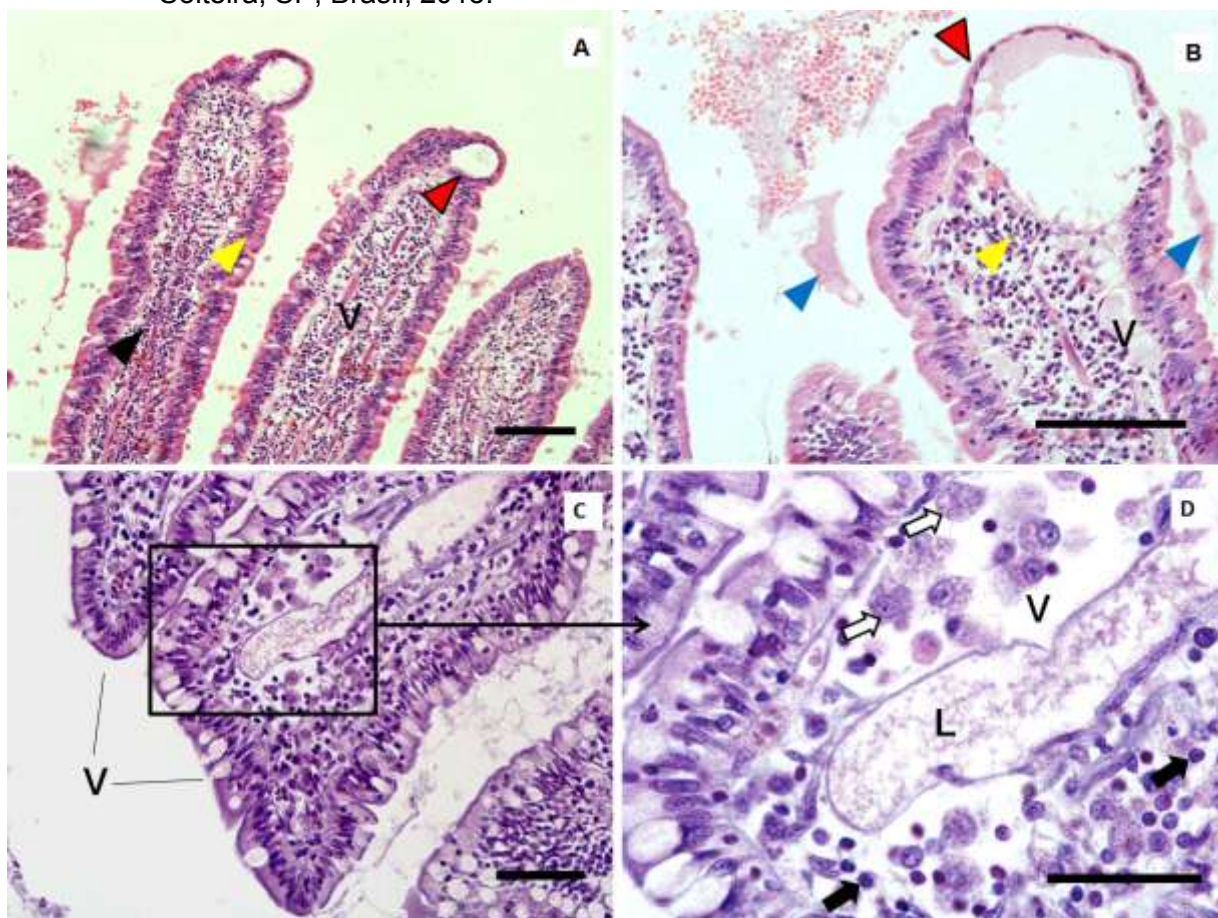


Figura 4. Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC. A: cripta basal do cólon (objetiva 40x) parasitado. B: maior aumento de A (objetiva 100x) em detalhes do quadrado preto, com inúmeras amastigotas dentro e fora de macrófagos hipertrofiados (pequenas setas pretas) e uma cripta atrófica ao centro. C: interrupção da *muscularis* mucosa (barra preta), com infiltrado de células inflamatórias na submucosa e na mucosa (retângulo preto) (objetiva 20x). D: maior aumento de C (objetiva 100x): com amastigotas livres (pequenas setas pretas), macrófagos com parasitas (setas brancas), e plasmócitos (ponta de seta preta) e células gigantes (seta vermelha). E: reação inflamatória crônica granulomatosa na submucosa (quadrado preto) (objetiva 20x). F: maior aumento de E (objetiva 100x) com muitos macrófagos infectados (pequenas setas pretas), linfócitos e células plasmáticas. M=mucosa; SM=submucosa; VCU=unidade de vilos e cripta; C=cripta; MM=*muscularis* mucosa. Coloração = H&E. Barras = 50 µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

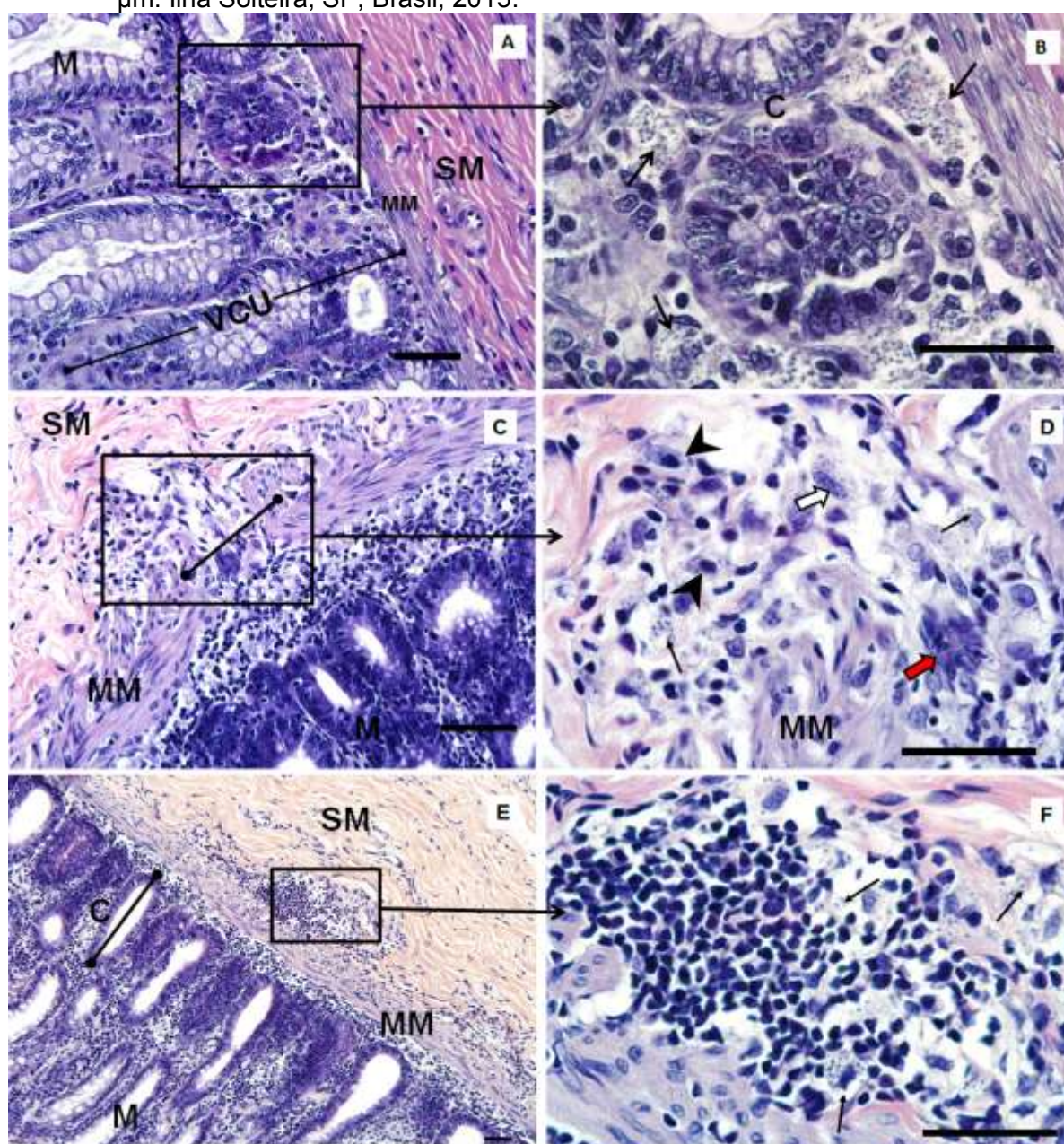


Figura 05. Alterações microscópicas (diarreia, reação HLP = reação histiolinfoplasmocitária, PMN=polimorfonucleares, congestão e hemorragia) consideradas relevantes no estudo de descrição histopatológica da mucosa intestinal de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

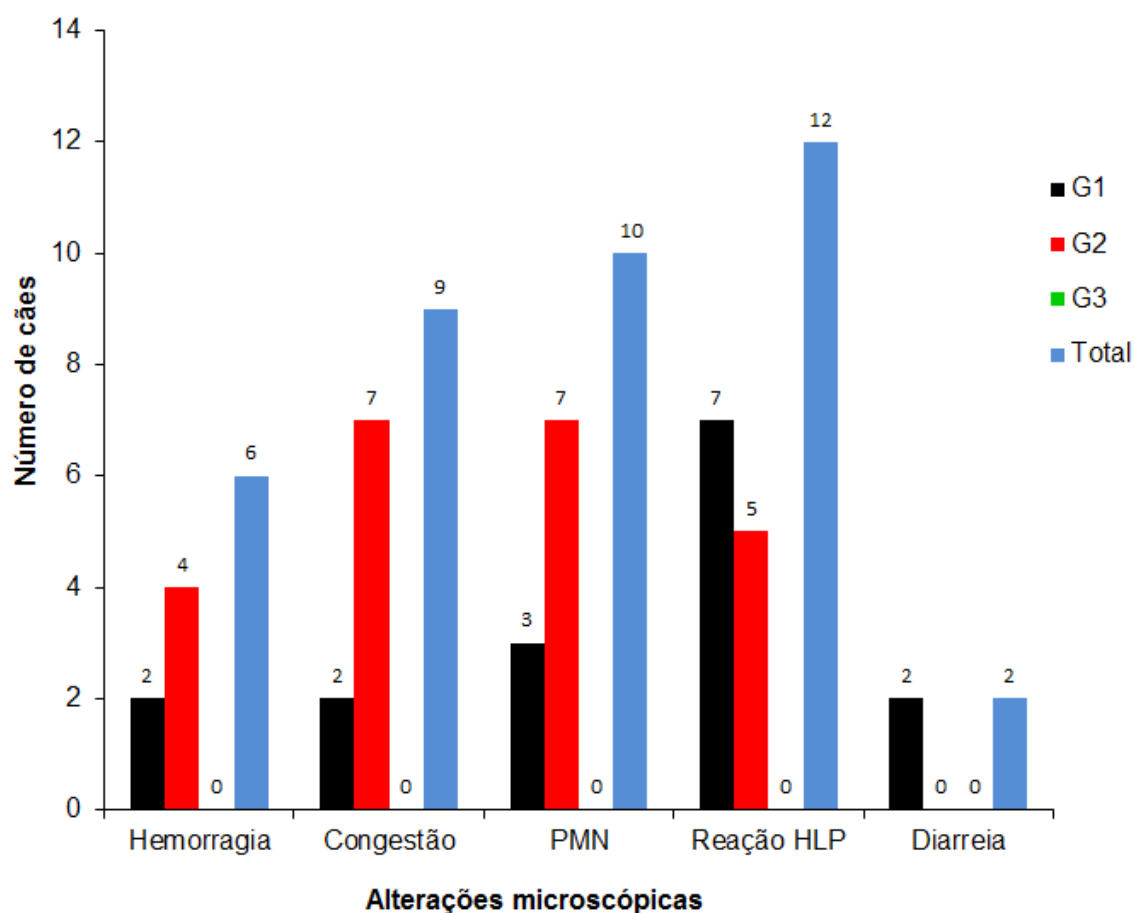
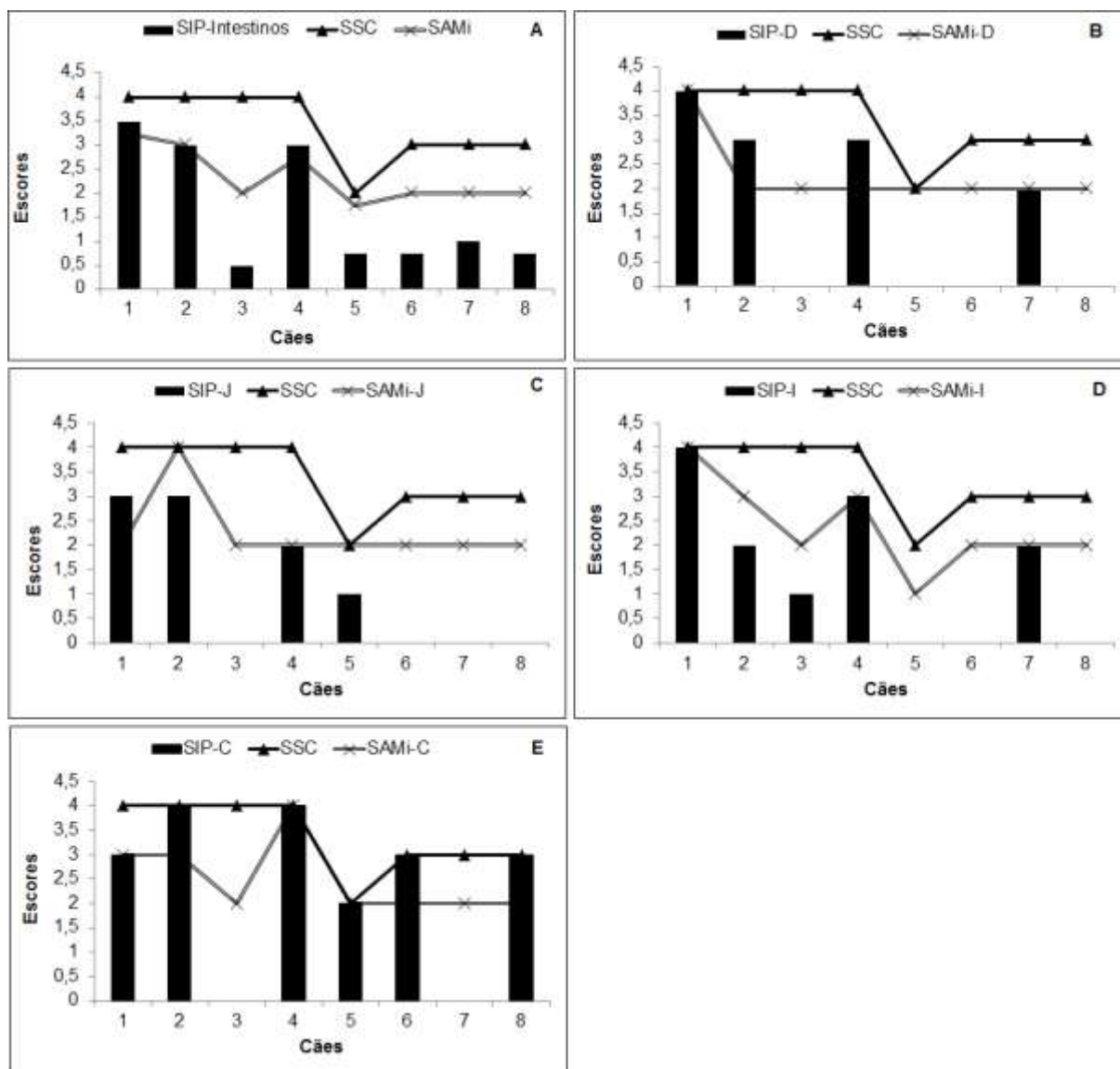


Figura 06. Análise de correlação observada entre a intensidade parasitária (SIP), a variável que representa as alterações microscópicas (SAMI) na mucosa intestinal, e os sinais clínicos gerais (SSC) de cães positivos com LVC e com amastigotas de *L. infantum* no intestino. A: média geral de todas as porções do intestino, B: duodeno (D), C: Jejuno (J), D: Ileo (I), E: Cólon (C). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.



**CAPÍTULO 4 - QUANTIFICAÇÃO E CORRELAÇÃO DE CÉLULAS
GRANULOCÍTICAS (NEUTRÓFILOS, EOSINÓFILOS E MASTÓCITOS) NO
INTESTINO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania*
*infantum***

**CHAPTER 4 - QUANTIFICATION AND CORRELATION OF GRANULOCYTIC
CELLS (NEUTROPHILS, EOSINOPHILS AND MAST CELLS) IN THE GUT OF
DOGS NATURALLY INFECTED WITH *Leishmania infantum***

**QUANTIFICAÇÃO E CORRELAÇÃO DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS
(NEUTRÓFILOS, EOSINÓFILOS E MASTÓCITOS) NO INTESTINO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum***

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi quantificar e correlacionar células granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Dos 20 cães avaliados, 17 estavam positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) e três negativos. Os cães positivos foram eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Ilha Solteira, SP, Brasil. Já os cães negativos vieram a óbito natural por acidentes em atropelamento no trânsito ou morte em procedimento cirúrgico. Todos os animais não apresentavam coinfeção parasitária intestinal, mediante aos exames coproparasitológicos realizados *in vivo* ou *pos-mortem*. Os cães foram divididos em três grupos de acordo com as seguintes características: grupo 1 (G1, n = 8) cães positivos para LVC e com amastigotas de *L. infantum* no intestino; grupo 2 (G2, n = 9) cães positivos para LVC, sem amastigotas intestinais; e, grupo 3 (G3, n = 3) cães negativos para LVC, grupo controle. A identificação das amastigotas do parasita no intestino e das células granulocíticas foi por meio dos métodos histoquímicos e imunoistoquímicos. A comparação estatística entre os grupos foi avaliada pelo teste t e, a análise de correlação foi de acordo com o teste de Pearson. De acordo com os dados obtidos, o número de células granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) apresentou-se aumentado significativamente a nível de 5% nos animais no grupo G2, seguido pelos animais do grupo G1, quando comparados com os cães do grupo controle (G3). Os polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) foram observados em maior número no intestino delgado do que no intestino grosso. Já os mastócitos se distribuíram semelhantemente nos dois intestinos (delgado e grosso) em cada grupo. Pela análise de correlação, os mastócitos e eosinófilos correlacionavam-se positivamente por todo o trato intestinal, sugerindo uma sinergia entre esses dois tipos celulares. Em conclusão, o maior número de células granulocíticas foi observado nos cães do G2 em relação ao G1 e G3 e isto significa que as formas amastigotas de *L. Infantum* presentes somente no G1, não foram responsáveis pela hiperplasia desses tipos celulares na parede intestinal de cães com LVC, mas possivelmente por outros agentes não parasitários.

Palavras-chave: Cães. Granulócitos. Leishmaniose visceral canina. Polimorfonucleares. Trato intestinal.

**QUANTIFICATION AND CORRELATION OF GRANULOCYTIC CELLS
(NEUTROPHILS, EOSINOPHILS AND MAST CELLS) IN THE GUT OF DOGS
NATURALLY INFECTED WITH *Leishmania infantum***

ABSTRACT - The aim of this work was to quantify and correlate the granulocytic cells (neutrophils, eosinophils and mast cells) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. 20 dogs were evaluated, which 17 were positive for canine visceral leishmaniasis (CVL) and three negative. The positive dogs were euthanized at Zoonosis Control Center (CCZ) from Ilha Solteira, SP, Brazil. The negative dogs had natural death due to accidents in traffic or death in surgery. All these animals did not showed parasite co-infection with gastrointestinal parasites by the fecal examinations *in vivo* or *post-mortem*. The dogs were divided into three groups according to the following features: group 1 (G1, n = 8) with LVC positive dogs and with amastigotes of *L. infantum* in the intestine; group 2 (G2, n = 9) were positive dogs CVL without intestinal amastigotes; and group 3 (G3, n = 3) were negative dogs for CVL, control group. The identification of the amastigotes of *L. infantum* in the gut and granulocytic cells was by histochemistry and immunohistochemistry methods. The statistical comparison between groups was evaluated by t test, and correlation analysis was according to the Pearson correlation coefficient. According to the data, the numbers of granulocytic cells (neutrophils, eosinophils and mast cells) were significantly increased ($p \leq 0.5$) in animals from G2, followed by the animals from G1, when compared with the control group of dogs (G3). The polymorphonuclear (neutrophils and eosinophils) were observed in higher numbers in the small intestine than in the large intestine. While mast cells were similarly distributed in the two intestines (small and large) of each group. For correlation analysis, mast cells and eosinophils positively correlated in the intestinal tract, suggesting a synergy between these two cell types. In conclusion, the greater number of granulocytic cells observed in dogs from group G2, compared to G1 means that the *L. infantum* amastigotes present only in G1 were not responsible by the hyperplasia of these cell types in the intestinal wall of dogs with CVL but may be by other non-parasitic agents.

Keywords: Dogs. Granulocytes. Canine visceral leishmaniasis. Polymorphonuclear. Intestinal tract.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma enfermidade parasitária crônica, causada por protozoários pertencentes ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), que infectam macrófagos de uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem e o cão (DE LUCA et al., 1999; NIETO et al., 1999).

A LVC é uma doença que tem como agente etiológico as espécies *Leishmania (Leishmania.) donovani* encontrada na Índia, Bangladesh e Nepal, a *Leishmania (L.) infantum* de manifestação na bacia do Mediterrâneo, o chamado “Velho Mundo”, Europa, África e China, e a *Leishmania (L.) chagasi* encontrada nas Américas do Norte, Central e do Sul, denominado como “Novo Mundo” (LAISON; SHAW, 1987; WHO, 2002). A constituição morfológica das espécies *L. (L.) chagasi* e *L.(L.) infantum*, são muito semelhantes, onde alguns autores compararam suas estruturas em estudos bioquímicos e moleculares e sugeriram que as espécies podem ser consideradas como uma única espécie formando um grupo monofilético dentro do complexo *Donovani*, permitindo assim que denominem de *L. (L.) infantum* o agente etiológico desta zoonose também nas Américas (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000; MAURÍCIO et al., 1999; KUHLS et al., 2011).

A principal forma de transmissão do parasito para o ser humano e outros hospedeiros mamíferos é pela picada da fêmea infectada de insetos hematófagos da ordem *Diptera*; família *Psychodidae*; subfamília *Phlebotominae*, conhecidos popularmente como mosquitos palha, Birigui ou tatuquiras, e que consistem de várias espécies do gênero *Lutzomyia*, dentre as quais a *L. longipalpis* de tamanho bastante reduzido, cerca de 2 a 3 mm (DEANE; DEANE, 1955; ALENCAR et al., 1991; CASTRO, 1996; RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Na epiderme do hospedeiro durante o repasto sanguíneo do inseto infectado, ocorre a inoculação da saliva, que modula a resposta imune local e também das formas promastigotas na pele do hospedeiro. Uma vez inseridas, as formas promastigotas são fagocitadas inicialmente por neutrófilos que são capazes de eliminar o parasita por uma série de mecanismos leishmanicidas, contudo uma pequena população parasitária pode sobreviver em seu interior e levar a

perpetuação do parasita por uma importante via de escape da resposta imune inata. (PERARSON; STEIGBIGEL, 1981; LASKAY et al., 2003). Quando as promastigotas são fagocitadas por macrófagos, elas se diferenciam rapidamente em formas amastigotas, com formato arredondado e sem flagelo. Essas formas se multiplicam até que ocorra o rompimento dos macrófagos e neutrófilos inicialmente infectados, e então, as formas amastigotas liberadas infectam novos macrófagos, resultando no desenvolvimento da doença (OLIVEIRA, 2003).

Após o processo de infecção, as leishmânias ficam susceptíveis à ação de neutrófilos, porém, a rápida inclusão do parasita nos macrófagos permite sua fuga dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos (MACHADO et al. 2004). Deste modo, o parasita inicia sua tarefa de expansão pelas células do sistema mononuclear fagocitário. A função dos neutrófilos vem sendo avaliada tanto na fase inicial quanto em fases avançadas da leishmaniose, na tentativa de entender a susceptibilidade dos animais à doença, já que essas células são a primeira linha de defesa do organismo (CIARLINI et al., 2010; GÓMEZ-OCHOA et al., 2010). No entanto, os protozoários do gênero *Leishmania* conseguem evadir ao sistema imune e perpetuar a infecção.

Existem evidências de que o parasita, no estabelecimento da infecção, seria capaz de inibir o metabolismo oxidativo neutrofílico e prolongar a sobrevivência da célula, fazendo com que o neutrófilo funcione como “cavalo de Tróia” no início da infecção (LASKAY et al., 2003). Entretanto, em cães com a doença já estabelecida há aumento da produção de superóxido em neutrófilos (CIARLINI et al., 2010; GÓMEZ-OCHOA et al., 2010), o que poderia contribuir de forma significativa para o estresse oxidativo.

A alteração neutrofílica observada na leishmaniose canina é dependente do estágio da doença, onde um aumento significativo da produção de superóxido pode ocorrer nos estágios iniciais da doença e um discreto decréscimo nos estágios finais da doença, quando o quadro de uremia decorrente de uma doença renal crônica (DRC) está instalado (GÓMEZ-OCHOA et al., 2010).

Outras células granulocíticas como mastócitos e eosinófilos também são importantes no controle e manutenção da *Leishmania* spp. em seus hospedeiros. Estudos realizados por Pearson et al. (1987) demonstraram que os eosinófilos

apresentam capacidade microbicida frente a *Leishmania* spp. e Wershil et al. (1994) verificaram mastócitos envolvidos na regulação da imunidade contra várias espécies de leishmanias.

A ativação dos eosinófilos, num microambiente contendo interferon-gama (IFN- γ) pode ocasionar a estimulação da produção de vários mediadores inflamatórios. Além disso, a expressão de receptores, tais como receptores Toll-4, 7 e 8 na superfície celular dos eosinófilos ativados por IFN- γ poderia representar uma importante via de interação entre eosinófilo - *Leishmania* spp, promovendo a eliminação do parasito por essas células (NAGASE et al., 2003).

Já os mastócitos em peles de camundongos infectadas com *Leishmania major* são necessários para o recrutamento de macrófagos durante a formação do granuloma cutâneo, sendo uma característica típica de resposta inflamatória induzida pelo parasita. No entanto a proteção da pele por mastócitos depende das conseqüências patológicas da infecção parasitária e está relacionada com a resposta imune inata e adaptativa (VON SEBUT et al., 2003).

Em estudo experimental Saha et al. (2004) revelaram um aspecto novo da interação patógeno-hospedeiro (*Leishmania* spp. versus ratos) em que os mastócitos desempenharam um papel pró-parasita em hospedeiros suscetíveis, mas um antiparasitário em hospedeiros resistentes. O parasita induzia uma infiltração de mastócitos no início da infecção em ratos suscetíveis, enquanto controlava essa infiltração em ratos resistentes, exemplificando o fundamental *modus operandi* do parasita, que é o desvio da resposta imune protetora do hospedeiro, para garantir a sua sobrevivência. Em hospedeiros resistentes, Gordon; Galli (1994); Macdonald et al. (1996) demonstraram que os mastócitos foram responsáveis por matar o parasita logo após a infecção, enquanto num hospedeiro suscetível, incapaz de matar o parasita, os mastócitos regulavam a fibrose ou a formação de granulomas no fígado e na medula óssea como estratégia para conter o parasita, restringindo sua migração e expansão para outros órgãos.

Recentemente o papel dos mastócitos foi designado como sentinelas nas reações de defesa do hospedeiro contra patógenos (MAURER et al., 2006). Os mastócitos podem regular células T dependentes de respostas imunes, tanto diretamente (expressão de MHC classe II, produção de fatores quimiotáticos,

liberação de citocinas do tipo Th1 ou Th2-citocinas) como indiretamente por meio da regulação da migração de células dendríticas, maturação e função (GALLI; NAKAE; TSAI, 2005).

A relação das células granulocíticas com a mucosa intestinal de cães naturalmente infectados por *L. infantum* intestinal ainda não foi estudada. Portanto, o objetivo deste estudo foi quantificar e correlacionar as células granulocíticas presentes no trato intestinal de cães com as formas amastigotas desse parasita.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e local

Para este estudo, foram avaliados 20 cães provenientes dos municípios de Ilha Solteira e Andradina, localizados na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. Desses animais, 17 foram diagnosticados positivos para LVC e eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, e três não tinham leishmaniose (grupo controle), mas vieram a óbito natural por acidentes em atropelamento no trânsito ou morte em procedimento cirúrgico. Todos os animais não apresentavam coinfecção parasitária com parasitos gastrintestinais, mediante aos exames coproparasitológicos realizados *post-mortem* conforme descrito no capítulo 2, item 1.10.

Este trabalho teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS-Unesp), Departamento de Biologia e Zootecnia, sob expedição do protocolo nº 06/2014-CEUA.

2.2 Diagnóstico para LVC e eutanásia

Os cães foram diagnosticados com LVC durante o inquérito epidemiológico da doença no município de Ilha Solteira, realizado pelo CCZ da cidade. A condição para o diagnóstico seguiu os procedimentos descrito no capítulo 2.

Os animais diagnosticados positivos foram eutanasiados obedecendo ao Decreto nº 51.838 do Ministério da Saúde, Brasil, conforme procedimentos

aprovados pela resolução 1000/2012 do CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária).

2.3 Coleta e preparo das amostras teciduais

Após a constatação do óbito, amostras de fezes e conteúdo do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) e grosso (cólon ascendente) foram coletadas, identificadas, acondicionadas em gelo e enviadas ao laboratório para análises coproparasitológicas.

Fragmentos dos tecidos intestinais foram coletados (0,5 a 1 cm) e fixados em solução formalina tamponada a 10% (tampão fosfato 0,01M) por 24 horas. Após os tecidos foram lavados com álcool 70% e desidratados por passagens sucessivas em etanol 70%, 80%, 90% e 100%. Posteriormente, realizou-se a diafanização do tecido, a impregnação com parafina e a formação dos blocos. Em seguida os blocos foram congelados a -20°C e então submetidos à secção de cortes em micrótomo (5 µm) para montagem das lâminas histológicas.

2.4 Histoquímica

As lâminas com cortes histológicos foram submetidas à técnica padrão de histologia e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para identificação das formas amastigotas do parasita e dos neutrófilos. Por essa técnica a presença das amastigotas de *L. infantum* e dos neutrófilos foi avaliada sob um microscópio óptico, em três secções de cada tecido intestinal.

A coloração histoquímica das células mastócitos e eosinófilos foi de acordo com a técnica descrita por Duffy et al. (1993). Resumidamente os corantes “*Astra Blue*” (#34195; Merck Led, Poole England) e “*Direct Red 75*” (Fluka Chemie AG CH-9470) foram utilizados para marcar mastócitos e eosinófilos respectivamente. O tempo das amostras em cada corante foi de 30 minutos. Após este período as lâminas foram lavadas com água destilada e colocadas em solução de hematoxilina de Mayer. Após a desidratação dos tecidos, as lâminas foram montadas sob lamínulas em balsamo do Canadá.

2.5 Imunoistoquímica

Para identificação das formas amastigotas de *L. infantum* nos tecidos por meio da imunoistoquímica, adotou-se a técnica de Tafuri et al. (2004) com algumas modificações feitas por Queiroz et al. (2011). As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas em peróxido de hidrogênio a 30% (Fluka Chemie AG CH-9470 Buchs) para bloquear a atividade da peroxidase endógena, seguindo-se à incubação com soro normal de cabra (diluição 1:50) para bloquear as reações inespecíficas da imunoglobulina com o tecido. O soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *L. infantum* (diagnosticado pelo ELISA e RIFI; com título de 1:2560), foi usado como o anticorpo primário. O anticorpo secundário foi o anti-IgG de coelho biotilado produzido em cabra (BA-1000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) (reação imunológica cruzada com IgG de cães). Após três lavagens adequadas em tampão fosfato 0,01M (pH = 7,4) os tecidos foram incubados com o complexo “Avidin-Biotin Peroxidase” (Vectastain ABC Kit PK 6200; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) que serviu para detecção da reação imunológica. Novamente os tecidos foram lavados e então adicionados a eles o substrato cromógeno específico para peroxidase (Nova RED™ substrate Kit SK-4800; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Após a reação e coloração das amastigotas, os tecidos foram lavados, contra corados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montadas com lamínulas em balsamo do Canadá.

2.6 Quantificação celular

A quantificação dos tipos celulares (neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) foi realizada na região da mucosa (unidade vilo/crípta - UVC), onde se contou as células presentes na lâmina própria de 15 UVCs de cada porção intestinal (duodeno, jejuno, íleo e cólon) escolhendo-se as vilosidades que mais se igualavam em altura e largura. Na submucosa (SM) e muscular (Mu) quantificou-se o número de cada tipo celular presente em 15 áreas de 0,5mm² de cada região (UVCs, SM, Mu).

As células foram identificadas e quantificadas em duas secções teciduais por animal de cada grupo, por microscopia de luz branca no aumento da objetiva de 40x para mastócitos e 100x para eosinófilos e neutrófilos. Estas contagens foram realizadas, sem conhecimento prévio da identidade de cada lâmina.

2.7 Grupos experimentais

Os cães foram divididos em três grupos, conforme descrito no Capítulo 2, item 1.11 deste trabalho. Onde, grupo 1 (G1): cães com LVC, e parasitados no intestino com amastigotas de *L. infantum* (n = 8); grupo 2 (G2): cães com LVC, porém sem a presença do parasita *L. infantum* no intestino (n = 9); e o grupo 3 (G3): cães negativos para LVC (n = 3, grupo controle). A identificação das amastigotas de *L. infantum* foi realizada pelas técnicas de imunoistoquímica e histoquímica.

2.8 Delineamento estatístico

A comparação de médias entre as regiões avaliadas (UVC, SM e MM) nas porções intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) e a comparação entre os grupos (G1, G2, G3) foi pelo test (t). Para a análise de correlação entre os tipos celulares (neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) no intestino delgado e grosso considerou apenas a região UVC, avaliado pelo coeficiente de correlação linear de Pearson. Ambos os testes com intervalo de confiança de 95% onde valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente. Todas as análises foram geradas no programa R, versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

3 RESULTADOS

A quantificação das células granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) realizada na mucosa intestinal de cães com LVC, com amastigotas do protozoário *L. infantum* no trato intestinal (grupo G1) e sem amastigotas (grupo G2), foi comparado com cães negativos para a doença (grupo controle). Para esse estudo, foram avaliados 20 cães, e destes, 85% (17/20) eram positivos e

sintomáticos para LVC. Pela análise histoquímica e imunoistoquímica dos tecidos intestinais, 40% (8/20) dos cães apresentavam formas amastigotas de *L. infantum* em pelo menos uma porção do intestino (duodeno, jejuno, íleo e cólon) e foram classificados como grupo 1 (G1). Já os animais positivos para a doença, porém com ausência do protozoário *L. infantum* nos tecidos correspondendo a 45% (9/20), foram classificados como grupo 2 (G2). No entanto, 15% (3/20) dos animais sorologicamente e parasitologicamente negativos para LVC foram agrupados no grupo controle, designado como grupo 3 (G3).

3.1 Neutrófilos

Os neutrófilos foram quantificados em toda a parede intestinal, incluindo a mucosa, representada pela unidade vilosa cripta (UVC), a submucosa (SM) e camada muscular (Mu), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e no intestino grosso (cólon).

Pela quantificação de neutrófilos, verificou-se que em todos os segmentos intestinais (intestino delgado e grosso), encontrou-se aumentado o número desse tipo celular nos cães do grupo G2, seguido pelo grupo G1 quando comparados com os animais controle (G3).

Foi na região da mucosa (UVCs) onde o maior número de neutrófilos foi identificado, seguido da submucosa, e na camada muscular quase não foram encontrados. Nas UVCs do duodeno, jejuno e cólon observou-se um aumento celular significativo de neutrófilos a 5% para os cães do G2 e G1 quando comparado com os animais controles (G3). Entretanto, o aumento de neutrófilos na região UVC do íleo foi estatisticamente significativa apenas para os cães do G2 em relação aos animais do G1 e G3 (Tabela 06 e Figura 7 A). O íleo foi o segmento intestinal com maior número celular na mucosa (UVC), ou seja, a média de neutrófilos no G1 foi ($2,3 \pm 0,3$), no grupo G2 ($8,2 \pm 0,8$), e no grupo G3 ($1,4 \pm 0,7$). Porém, nessa mesma região (UVC) o menor número de neutrófilos foi observado no cólon, onde os cães do G1 apresentaram média de ($1,6 \pm 0,3$), já os cães do G2 ($4,9 \pm 0,5$), e nos animais controle (G3) essa média foi ainda menor ($0,7 \pm 0,4$) (Tabela 06).

Todavia, em uma observação geral na região da mucosa (UVC), Tabela 06, observou-se que todos os segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) dos animais do G1 e G2 apresentaram uma quantificação de neutrófilos superior e significativa em relação ao cólon (intestino grosso), indicando um predomínio desse tipo celular na UVCs do intestino delgado.

Já na região da submucosa (SM), não se observou diferença significativa na contagem celular de neutrófilos entre as amostras de cães dos três grupos de animais para o duodeno. Entretanto, na submucosa (SMs) do jejuno e do íleo a diferença de células não foi significativa entre o grupo G1 e o controle (G3), mas foi em relação ao G2, com maior número celular nesse grupo. No intestino grosso (cólon) os três grupos diferiram estatisticamente entre si (Tabela 06 e Figura 07 B).

A região muscular (Mu) em todas as porções intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) não apresentou diferença significativa para neutrófilos entre os animais (Tabela 06 e Figura 07 C), indicando que os números de neutrófilos quantificados na região muscular do trato intestinal de todos os animais avaliados foram semelhantes estatisticamente.

3.2 Eosinófilos

Em todas as porções do intestino delgado e grosso (duodeno, jejuno, íleo e cólon), especificamente na região UVC, constatou-se um aumento de eosinófilos nos tecidos intestinais de cães com LVC e sem amastigotas de *L. infantum* no intestino (G2). Em segundo lugar ficaram os cães com LVC e com amastigotas intestinais (G1). A elevação desse tipo celular nos animais de ambos os grupos (G1 e G2) na região UVC foi significativa a 5% quando comparados entre si, e também com os cães do grupo controle (G3) (Tabela 07, Figura 8 A).

Assim como observado para neutrófilos, na região UVC, os segmentos do intestino delgado dos cães dos grupos G1 e G2 apresentaram maior número de eosinófilos do que o cólon (intestino grosso). Para os animais do G1 a região UVC do duodeno foi o segmento intestinal com maior número de eosinófilos com média de $3,1 \pm 0,8$. Já nos animais do G2, esse aumento foi observado no íleo, com média de $5,95 \pm 0,58$. Em ambos os grupos esses aumentos foram significativos em

relação ao grupo controle G3, que para o duodeno apresentou média de $0,9 \pm 0,1$ e para o íleo foi de $0,8 \pm 0,2$ (Tabela 07).

A quantificação de eosinófilos na submucosa (SM) das porções intestinais (duodeno, jejuno e cólon) dos cães do G2 também foi significativa a 5% em relação as mesmas áreas dos animais do grupo G1 e G3, com exceção apenas para o íleo, onde não houve diferença desse tipo celular na submucosa entre os animais dos três grupos. O número de eosinófilos quantificados na SM do jejuno e cólon dos cães do G1 foi semelhante estatisticamente aos dos cães do G2, porém, ambos foram significativos ($p \leq 0,05$) em relação aos animais controles (G3) (Tabela 07 e Figura 08 B).

Os eosinófilos quantificados na região muscular de todo o trato intestinal também não apresentaram diferenças estatísticas entre as porções intestinais dos cães classificados em cada grupo (Tabela 07 e Figura 08 C).

3.3 Mastócitos

Os mastócitos foram visualizados na lâmina própria, região UVC de todos os segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon), com aumento significativo nos animais do grupo G1 e G2, sempre comparando com os valores observados nas amostras dos animais controle (G3). A quantificação de mastócitos na região UVC dos grupos G1 e G2 também diferiram estatisticamente entre si, com maior número nos animais do G2 (Tabela 08 e Figura 9 A).

O jejuno foi o segmento intestinal em que este tipo celular esteve em maior número para os animais do G1 e G2, e esta observação se estendeu para todas as regiões avaliadas (UVC, SM e Mu) (Tabela 08). A média de mastócitos no jejuno dos cães do G1 foi de $8,3 \pm 1,0$ para a UVC, de $5,9 \pm 0,9$ para SB e de $5,6 \pm 0,9$ para Mu. Já no jejuno dos cães do G2, esse número foi ainda maior, onde na região UVC a média foi de $15,2 \pm 1,0$; na SB foi de $13,1 \pm 0,9$; e na Mu foi de $8,8 \pm 1,1$. Todos esses valores foram superiores e significativos em relação a quantificação de mastócitos no jejuno dos cães controles (G3), cuja média para a região UVC foi de $4,6 \pm 0,3$; para SB de $3,5 \pm 0,4$; e para Mu foi de $2,2 \pm 0,3$.

Na submucosa do duodeno, o aumento de mastócitos observado nos animais do G2 foi estatisticamente diferente dos cães do G1 e dos cães controle (G3), porém na submucosa do jejuno e cólon, o aumento dessa célula ocorreu tanto nos animais do G1 e G2, e ambos foram significativos em relação aos animais controle (G3). Já na submucosa do íleo, a quantificação de mastócitos foi estatisticamente semelhante entre os três grupos (G1, G2, G3) (Tabela 08 e Figura 09 B).

A região muscular (Mu), que até então, não tinha apresentado diferença estatística entre os cães dos três grupos para a quantificação de neutrófilos e eosinófilos, mostrou-se diferente para os mastócitos. Observou-se um aumento significativo de mastócitos no duodeno e jejuno nos cães do G1 e G2, em relação à contagem dessa célula na muscular dos mesmos segmentos dos animais controle (G3). Na muscular do íleo dos cães do G2, os mastócitos estiveram significativamente aumentados em relação aos cães do G1 e G3. Já no cólon, o aumento de mastócitos na região muscular dos cães do G1 e G2 não diferiu estatisticamente, porém foi significativo em relação ao grupo controle (G3) (Tabela 08 e Figura 09 C).

Neste estudo, diferente do que foi observado para neutrófilos e eosinófilos, cujo predomínio dessas células foi maior no intestino delgado quando comparado com o intestino grosso, para mastócitos isso não foi observado. Estatisticamente, o número de mastócitos foi igual para todos os segmentos intestinais avaliados dentro de cada grupo, discordando é claro, quando essa comparação foi feita entre os grupos. Isto quer dizer que, dentro de cada grupo, os mastócitos se distribuíam homogeneamente tanto no intestino delgado como no intestino grosso.

3.4 Correlação entre os três tipos celulares

Na tabela 09, é possível observar a análise de correlação dos tipos celulares (neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e no intestino grosso (cólon) nos animais dos três grupos (G1, G2, G3). O teste escolhido foi o de correlação linear de Pearson.

Primeiramente, com os animais do grupo 1 (G1), observou-se que os neutrófilos do intestino delgado se correlacionam linearmente com o número de

eosinófilos do intestino grosso e vice-versa ($p = 0,71$), significativo a 5%. Entretanto, esta correlação foi inversa (negativa) para os neutrófilos do intestino grosso e eosinófilo do intestino delgado ($p = -0,8$), significativo a 5%. Isto quer dizer que, no primeiro caso, enquanto o número de neutrófilos aumentava no intestino delgado, isso também ocorria com os eosinófilos no intestino grosso. Já no segundo caso, ocorria uma inversão não proporcional, pois enquanto o número de neutrófilos diminuía no intestino grosso, o de eosinófilos no intestino delgado aumentava. Assim os eosinófilos estavam sempre correlacionados entre si positivamente ($p = 0,75$), significativo a 5%, tanto no intestino delgado como no intestino grosso (Tabela 09).

Com os animais do grupo 2 (G2), a interação celular ocorreu entre eosinófilos e mastócitos. O número de eosinófilos apresentou correlação positiva com o número de mastócitos tanto do intestino delgado ($p = 0,71$), significativo a 5%, como no intestino grosso ($p = 0,85$), significativo a 1% (Tabela 09). Do mesmo modo, este tipo de interação ocorreu para mastócitos em relação aos eosinófilos e, ainda, na Tabela 09, verificou-se que os mastócitos presentes no intestino delgado e grosso também apresentaram correlação significativa e positiva entre si ($p = 0,73$).

Nos animais do grupo 3 (G3), a situação relatada acima foi inversa, ou seja, os eosinófilos do intestino grosso se correlacionaram de forma negativa com os mastócitos do intestino delgado ($p = -1,00$), significativo a 1%. Com isso, à medida que o número de eosinófilos aumentava no intestino grosso, o número de mastócitos decaía no intestino delgado, ou vice-versa. No entanto, deve-se salientar, que a quantidade desses tipos celulares para os animais desse grupo foram baixas (Tabela 09).

Na figura 10 (A e B) é possível observar no cólon de um cão com LVC, porém sem amastigotas de *L. infantum* no intestino (G2), os neutrófilos nas vilosidades e criptas (UVC) e também na submucosa. Já na figura 10 (D e E) os eosinófilos podem ser visualizados (corados em vermelho) distribuídos na lâmina própria, entre as vilosidades, mas principalmente na base da cripta. Os mastócitos facilmente encontrados em todas as regiões do trato intestinal estavam presentes nas vilosidades e criptas (Figura 11 A e B), na submucosa e associados ao plexo nervoso mioentérico (Figura 11 C), e também na camada muscular lisa, tanto na

túnica muscular circular interna (CM), como na longitudinal externa (LM) (Figura 11 D).

4 DISCUSSÃO

4.1 Avaliação das células: neutrófilos, eosinófilos e mastócitos

Durante o estabelecimento da infecção, a *Leishmania* spp. é capaz de inibir o metabolismo oxidativo neutrofílico e prolongar a sobrevivência da célula, fazendo com que o neutrófilo funcione como “cavalo de Tróia” no início da infecção, permitindo assim a replicação e expansão do parasito no hospedeiro (LAUFS et al., 2002; LASKAY et al., 2003). Entretanto, em cães com a doença já estabelecida, há aumento da produção de superóxido em neutrófilos (CIARLINI et al., 2010; GÓMEZ-OCHOA et al., 2010), o que poderia contribuir de forma significativa para o estresse oxidativo. De acordo com os dados desse trabalho, observou-se hiperplasia de neutrófilos nos animais do G1 e G2 na região UVC, porém, neste estudo, não foi avaliado o metabolismo oxidativo dessas células e por isso, não se pode afirmar a participação dessas células na instauração do parasitismo no trato intestinal com relação aos animais do G1, ou na produção de superóxido que poderia estar prevenindo o parasitismo no intestino nos cães do G2. Entretanto, a hiperplasia desse tipo celular nesses grupos indica a presença de reações inflamatórias, independentes da capacidade do protozoário *L. infantum* imunorregular ou inibir a ação neutrofílica, pois os neutrófilos ainda possuem importante função frente às infecções em cães com LVC, principalmente em infecções secundárias oriundas da ação imunossupressora causada por esse parasita. Com alta capacidade fagocitária, os neutrófilos recebem estímulos dos receptores Toll-like para reconhecer padrões moleculares associados com os patógenos (PAMPs) no intuito de eliminá-los (MESQUITA-JUNIOR, 2008), o que explicaria o aumento dessas células em infecções bacterianas.

Aumento no número de eosinófilo também ocorreu significativamente nos tecidos intestinais dos grupos G1 e G2 de cães com LVC. Acredita-se que a ativação dos eosinófilos, num microambiente contendo IFN- γ levaria a estimulação da

produção de vários mediadores inflamatórios. Além disso, a expressão de receptores, tais como receptores Toll-4, 7 e 8 na superfície celular dos eosinófilos ativados por IFN- γ poderia representar uma importante via de interação eosinófilo-*Leishmania* spp. que promoveria a eliminação do parasito por essas células (NAGASE et al., 2003). Dessa forma, o envolvimento de eosinófilos observados nos animais do G2, onde amastigotas de *L. infantum* estavam ausentes no trato intestinal, poderia representar um mecanismo leishmanicida adicional. Os eosinófilos são células importantes no combate às infecções no geral, sendo sua ação antiparasitária, especialmente contra helmintos, uma das células mais potentes e eficazes do organismo no combate de parasitas (MESQUITA-JUNIOR, 2008). No entanto, são necessários mais estudos, para saber ao certo a real colaboração dessas células no combate às infecções por *L. infantum*.

Como um dos destaques desse trabalho, os polimorfonucleares (PMN) como os neutrófilos e os eosinófilos, apresentaram-se em maior número no intestino delgado dos cães dos grupos G1 e G2, com diferenças estatísticas em relação ao intestino grosso, onde essas células estiveram em baixas contagens. No entanto, no grupo G1, observou-se maior intensidade de parasitas no intestino grosso, diferente da distribuição de PMN, indicando que, onde havia maior número do parasito *L. infantum* ocorria uma redução no número de PMN. Similarmente nas submucosas do íleo dos cães do grupo G1 não se observou hiperplasia dos PMN, sendo que nesse segmento e região também foi encontrado o parasita *L. infantum*.

Segundo Simecka (1998), apesar de um estímulo antigênico ocorrer em um local particular na mucosa intestinal, como por exemplo, na primeira porção do intestino delgado, a resposta a este estímulo, como a secreção de mediadores inflamatórios e a sensibilização celular, pode estender-se para outras porções intestinais, possivelmente através da circulação sanguínea e/ou linfática que drena toda mucosa intestinal, as placas de Peyer e/ou os linfonodos mesentéricos. Desta forma, a mucosa de todo o intestino e mesmo as mucosas mais distantes, como por exemplo, do trato urogenital e respiratório estariam também protegidas contra possíveis invasores (NEVES, 2006).

Assim como nos neutrófilos e eosinófilos, os mastócitos estavam aumentados nos tecidos intestinais dos cães dos grupos G1 e G2, com significância de 5% em

relação ao grupo controle G3. De acordo com Levy; Frondoza (1983) os mastócitos estão sempre associados às infecções parasitárias, e, além disso, podem proporcionar proteção contra agentes patogênicos bacterianos (HENZ, et al., 2001) e são importantes células sentinelas da imunidade inata para reações de defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares complexos (MAURER et al. 2006). Neste trabalho, os mastócitos estiveram presentes nos vilos e criptas, na submucosa, e associados ao plexo nervoso mioentérico, e também na camada muscular das porções do intestino delgado e grosso de cães positivos para LVC, com ou sem amastigotas de *L. infantum* intestinal, sendo assim, a hiperplasia de mastócitos nessas regiões é indicativo de suas atividades de defesa a favor do hospedeiro, conforme relatado pelos autores acima.

Nutman (1993) e Maurer et al. (2006) acreditam que os mastócitos sejam uma das primeiras células a chegar ao local da infecção, e com a liberação de seus mediadores inflamatórios, possam recrutar elementos celulares pró-inflamatórios, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas na tentativa de provocar um ambiente desfavorável à sobrevivência do parasita. Nos cães do grupo G1, observou-se processos granulomatosos, geralmente na submucosa do intestino grosso (cólon), com presença de macrófagos e outras células mononucleares. Nesse contexto, sugere-se que possivelmente os mastócitos presentes no intestino dos cães do G1 estiveram associados ao recrutamento desses macrófagos, auxiliando na formação desses granulomas. A proteção desencadeada pelos mastócitos depende das consequências patológicas da infecção parasitária e envolve sua influência sobre a resposta imune inata e adaptativa (VON SEBUT et al., 2003).

Outro destaque deste trabalho é que os mastócitos, diferente dos PMN, teve distribuição semelhante tanto no intestino delgado como no intestino grosso, quando avaliados entre os animais do mesmo grupo. No entanto, mastócitos foi observado em número aumentado nos grupos G1 e G2 significando que a hiperplasia celular não foi necessariamente dependente das amastigotas intestinais.

4.2 Atividades imunossupressoras e imunorreguladoras

A imunossupressão causada por protozoários do gênero *Leishmania* pode gerar infecções oportunistas, dificultando o diagnóstico da leishmaniose visceral (SILVA, 2007). No presente estudo, acredita-se que os cães dos grupos G1 e G2, estivessem sofrendo uma imunossupressão em função desse parasito. Apesar dos cães serem positivos para LVC, eles não apresentaram amastigotas de *L. infantum* intestinal, mas apresentavam uma acentuada hiperplasia de PMN e mastócitos nos intestinos, que foi significativa em relação aos cães controle. Sugere-se indícios de alguma infecção oportunista no trato intestinal dos animais, principalmente do G2 indicando que os mesmos poderiam estar na fase aguda dessa infecção de origem desconhecida, ou, por exemplo, causada por algum tipo de bactéria.

Comparando os cães do G1 com os cães do G2, observou-se que existia uma redução significativa no número de PMN (neutrófilos e eosinófilos) e mastócitos no grupo G1 em relação ao G2, porém, os dados de quantificação celular do G1 foram superiores e significativos em relação aos cães controles (G3). No primeiro caso, acredita-se que os parasitas presentes no trato intestinal dos cães do G1 pudessem ter adaptado e regulado o sistema imunológico do hospedeiro levando a uma imunoregulação em favor da sua sobrevivência, explicando assim, a redução de células granulocíticas e elevação do número de células mononucleares, quando comparado aos animais do G2. Pinto et al. (2011) consideram que amastigotas de *L. infantum* ganham vantagem a partir da resposta imunorreguladora intestinal devido à tolerância imunológica. Isso explicaria a presença de grande quantidade de parasitas associados com fraca ou até ausência de hiperplasia de granulócitos, com aumentado número de mononucleares no G1. No segundo caso, a presença de amastigotas nas amostras dos cães do G1, já explicaria a diferença celular quando comparado com animais controles (sadios).

Dentre os fatores descritos na literatura como responsáveis pela imunossupressão na LVC, cita-se: o receptor solúvel de IL-2 (BARRAL-NETO et al., 1991), alteração nas células apresentadoras de antígeno (REINER et al., 1987; RODRIGUES-JÚNIOR et al., 1992a), TGF- β (RODRIGUES-JÚNIOR et al., 1998b) que estaria inibindo a atividade dos macrófagos (KEHRL et al., 1986) e ainda, a

diminuição da produção de óxido nítrico (NO) (MELBY et al., 2001). Nenhum desses fatores foi avaliado neste trabalho, necessitando-se assim de mais estudos para afirmar a imunossupressão dos animais estudados.

4.3 Correlação entre neutrófilos, eosinófilos e mastócitos

De acordo com as análises de correlação os tipos celulares (neutrófilos, mastócitos e eosinófilos), apresentaram correlações significativas entre si, variando de acordo com os grupos de cães estudados.

Para os cães do G1, ocorreu uma correlação positiva e significativa entre neutrófilos do intestino delgado com os eosinófilos do intestino grosso, porém essa associação foi negativa, quando se avaliou neutrófilos do intestino grosso com eosinófilos no intestino delgado. No grupo G1, os cães apresentavam-se infectados em intensidades variáveis nos diferentes segmentos e regiões da parede intestinal por *L. infantum*, oscilando em infecções agudas, no início do parasitismo do órgão, para infecções crônicas, quando a intensidade parasitária já estava muito alta. Com base nisso, sugere-se que os neutrófilos podem não ter tido influência na migração de eosinófilos nos tecidos dos cães com amastigotas de *L. infantum*, mas apenas uma quimiotaxia por substâncias quimiotáticas que atuam no recrutamento dessas células aos locais da infecção de acordo com as necessidades de cada situação (MESQUITA-JUNIOR, 2008). No entanto, não se pode afirmar que o mesmo ocorre entre a interação mastócitos e eosinófilos.

Já nos animais do grupo G2 houve uma correlação positiva e significativa entre mastócitos e eosinófilos tanto no intestino delgado como no intestino grosso, sendo significativa também a correlação de mastócitos nas duas porções do intestino. Entretanto, nos cães do grupo G3 (grupo controle) observou-se exatamente o contrário, e a correlação entre mastócitos e eosinófilos foi negativa estatisticamente. Meeusen; Balic (2002) apontam que os mastócitos, células exterminadoras naturais (NK) e linfócitos intraepiteliais (LIEs), podem secretar IL-5 e induzir a proliferação e migração de eosinófilos da medula óssea para o local da infecção. Desse modo, sugere-se uma possível sinergia entre esses dois tipos celulares, onde mastócitos podem atuar recrutando eosinófilos frente a algum tipo de

infecção, que é o que se parece com os cães do G2 e, na ausência das infecções, sem o estímulo dos mastócitos a população eosinófilos diminui, explicando assim o observado nos animais do G3.

5 CONCLUSÕES

- Nos animais do grupo G1, com LVC e com amastigotas intestinais, ocorreu menor aumento de células granulocíticas (eosinófilos, neutrófilos e mastócitos) do que no G2, sugerindo que *L. infantum* não foi responsável pela proliferação desses tipos celulares na parede intestinal.
- O maior número de células granulocíticas (eosinófilos, neutrófilos e mastócitos) foi encontrado nos cães do grupo G2, com LVC sem amastigotas intestinais.
- O número de células granulocíticas esteve em maior quantidade na lâmina própria da mucosa (UVC) em todos os segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon), seguidos da submucosa e da muscular.
- O intestino delgado apresentou o maior número dessas células granulocíticas em relação ao intestino grosso (cólon).
- Existe correlação significativa entre mastócitos e eosinófilos nos animais do grupo G1 e G2.

6 REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 716-717.
- BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A.; SANTOS, S. B.; CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; REED, S. G.; JOHNSON-JÚNIOR, W. D. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum mediated suppression in human visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 147, n. 1, p. 281-284, 1991.
- CASTRO, A. G. **Controle, diagnóstico e tratamento da Leishmaniose visceral (calazar)** – Normas técnicas. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 1996. p. 88.
- CIARLINI, P. C.; VALADARES, T. C.; IKEDA-GRACIA, F. A.; MARCONDES, M.; LIMA, V. M. F. L. Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com

leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 359-375, 2010.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 75-87, 1955.

DE LUCA, P. M.; MAYRINK, W.; ALVES, C. R.; COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P.; BERTHO, A. L. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Vaccine**, London, v. 17, p. 1179-1185, 1999.

DUFFY, J. P.; SMITH, J. P.; MATTEWS, H. R. Combined staining method for demonstration of tissue eosinophils and mast cells. **Journal of Histotechnology**, Leeds, v. 16, n. 2, p. 143-144, 1993.

GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nature Immunology**, New York, v. 6, p. 135-142, 2005.

GÓMEZ-OCHOA, P.; LARA, A.; COUTO, G.; MARCEN, J.M.; PERIS, A.; GASCÓN, M.; CASTILLO, J.A. The nitroblue tetrazolium reduction test in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 172, n. 1-2, p. 135-138, 2010.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, p. 647-664, 2004.

GORDON, J. R.; GALLI, S. J. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. **The Journal Experimental Medicine**, New York, v. 180, p. 2027-2037, 1994.

HENZ, B. M.; MAURER, M.; LIPPERT, U.; WORM, M.; BABINA, M. Mast cells as initiators of immunity and host defense. **Experimental Dermatology**, West Sussex, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2001.

KEHRL, J. H.; WAKEFIELD, L. M.; ROBERTS, A. B.; JAKOWLEW, S.; ALVAREZ-MON, M. DERYNCK, R.; SPORN, M. B.; FAUCI, A. S. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 163, n. 5, p. 1037-1050, 1986.

KÜHNEL, W. **Atlas de citologia, histologia, e anatomia microscópica para teoria e prática**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICKNKENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. New York: Academic Press, 1987. v. 1, p. 291-363.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.

LAUFS, H. MÜLLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J.C.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 70, n. 2, p. 826-835, 2002.

LEVY, A. M.; FRONDOZA, C. Immunity to intestinal parasites: role of mast cells and goblet cells. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 42, p. 1750-1755, 1983.

MACDONALD, A. J.; THORNTON, E. M.; NEWLANDS, G. F.; GALLI, S. J.; MOGBEL, R.; MILLER, H. R. Rat bone marrow-derived mast cells co-cultured with 3T3 fibroblasts in the absence of Tcell derived cytokines require stem cell factor for their survival and maintain their mucosal mast cell-like phenotype. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 88, n. 3, p. 375-383, 1996.

MAURER, M.; KOSTKA, S. L.; SIEBENHAAR, F.; MOELLE, K.; METZ, M.; KNOP J.; STEBUT E. V. Skin mast celles control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. **The FASEB Journal – Research Communication**, Bethesda, v. 20, p. 2460-2467, 2006.

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

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, New York, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.

MARSHALL, J. S.; BIENENSTOCK, J. Mast cells. **Springer Seminars in Immunology**, Heidelberg, v. 12, p. 191-202, 1990.

MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO W.; COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 166, n. 3, p. 1912-1920, 2001.

MEEUSEN, E. N. T; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the Killing of helminth parasites. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, p. 95-101, 2002.

MESQUITA-JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; DA SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C.; MELO-CRUVINEL, W. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Revista Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, v. 10, n.3, p. 66-81, 2008.

NAGASE, H.; OKUGAWA, S.; OTA, Y.; YAMAGUCHI, M.; TOMIZAWA, H.; MATSUSHIMA, K.; OHTA, K.; YAMAMOTO, K.; HIRAI, K. Expression and function of

toll-like receptors in eosinophils: activation by toll-like receptors 7 ligant. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 171, p. 3977-3982, 2003.

NEVES, M. F. **Resposta celular immune-inflamatória e de células caliciformes no intestino delgado de bezerros búfalo naturalmente infectados por *Toxocara vitulorum***. 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2006.

NIETO, C. G.; GARCÍANALONSO, M.; REQUENA, J. M.; MIRÓN, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 117-130, 1999.

NUTMAN, T. B. Mast cells and their role in parasitic helminth infection. In: KALINER, M. A.; METCALFE, D. D. (Eds). **The mast cell in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 669-689.

OLIVEIRA, R. S.; MACIEL, J. N. Aspectos socioeconômicos da Leishmaniose visceral em João Pessoa Paraíba – Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 7, n. 1, p. 63-70, 2003.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 1981.

PEARSON, R. D.; UYDESS, I. L.; CHAPMAN, S. W.; STEIGBIGEL, R. T. Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. **Annals of Tropical Medicine And Parasitology**, Leeds, v. 81, p. 735-739, 1987.

QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NORONHA-JÚNIOR, A. C. F.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 30 out. 2014.

REINER, N. E.; NG, W.; MCMASTER, W. R. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 138, n. 6, p. 1926-1932, 1987.

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, DF, v. 3, n. 11, p. 13-14, 1997.

RODRIGUES-JUNIOR, V.; SILVA, J. S.; CAMPOS-NETO, A. Selective inability of spleen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediated specific T cell proliferation to parasites antigens. **Parasite Immunology**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 49-58, 1992a.

RODRIGUES-JUNIOR, V.; SANTANA, S. J.; CAMPOS-NETO, A. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 66, n. 3, p. 1233-1236, 1998b.

ROSS, R. (1) note on the bodies recently described by *Leishmania donovani* and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, London, v. 2, p. 1261-1401, 1903.

SAHA, B.; TONKAL, A. M.; CROFT, S.; ROY, S. Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. **Clinical Experimental and Immunology**, West Sussex, v. 137, p. 19–23, 2004.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve uma visão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SIMECKA, J. W. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 34, p. 235-259, 1998.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; 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.

VON STEBUT, E.; METZ, M.; MILON, G.; KNOP, J.; MAURER, M. Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha/beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNF-alpha. **Blood**, Washington, DC, v. 101, p. 210–215, 2003.

WERSHIL, B. K.; THEODOS, C. M.; GALLI, S. J.; TITUS, R. G. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 152, p. 4563-4571, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record. **Relevé Épidémiologique Hebdomadaire**, Geneva, v. 77, n. 44, p. 365-372, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2002/wer7744.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2014.

Tabela 06. Número médio de neutrófilos no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon) de cães do grupo controle (G3) e de cães com leishmaniose visceral (LVC) em condições da presença de amastigotas de *L. infantum* no trato intestinal (G1) e na ausência do parasita no intestino (G2). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

QUANTIFICAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NO INTESTINO DE CÃES COM E SEM LVC			
Duodeno			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	3,27 ± 0,21 ^{aB}	1,67 ± 0,25 ^{bA}	0,44 ± 0,44 ^{cA}
G2	7,76 ± 0,65 ^{aA}	1,70 ± 0,73 ^{bA}	0,50 ± 0,32 ^{cA}
G3	2,33 ± 0,30 ^{aC}	0,82 ± 0,07 ^{bA}	0,27 ± 0,06 ^{cA}
Jejuno			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	2,55 ± 0,21 ^{aB}	0,72 ± 0,16 ^{bB}	0,35 ± 0,14 ^{cA}
G2	8,04 ± 0,87 ^{aA}	1,34 ± 0,29 ^{bA}	0,54 ± 0,46 ^{cA}
G3	0,62 ± 0,27 ^{aC}	0,33 ± 0,17 ^{aB}	0,20 ± 0,06 ^{aA}
Íleo			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	2,33 ± 0,26 ^{aB}	0,67 ± 0,18 ^{bB}	0,33 ± 0,23 ^{cA}
G2	8,23 ± 0,84 ^{aA}	1,44 ± 0,33 ^{bA}	0,39 ± 0,25 ^{cA}
G3	1,42 ± 0,71 ^{aB}	0,42 ± 0,03 ^{bB}	0,18 ± 0,07 ^{cA}
Cólon			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	1,56 ± 0,33 ^{aB}	0,84 ± 0,32 ^{bB}	0,22 ± 0,11 ^{cA}
G2	4,93 ± 0,50 ^{aA}	1,41 ± 0,39 ^{bA}	0,33 ± 0,22 ^{cA}
G3	0,67 ± 0,35 ^{aC}	0,24 ± 0,14 ^{aC}	0,09 ± 0,04 ^{aA}

Nota: VCU: unidade de vilo-crípta; SM: submucosa; Mu: camada muscular. Comparação de médias pelo test (t). Intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Em colunas: proporções (a/b/c) idênticas com letras minúsculas não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Em linhas: proporções (A/B/C) idênticas com letras maiúsculas não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análises geradas pelo programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

Tabela 07. Número médio de eosinófilos no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon) de cães do grupo controle (G3) e de cães com leishmaniose visceral (LV), em condições da presença de amastigotas de *L. infantum* no trato intestinal (G1) e na ausência do parasita no intestino (G2). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

QUANTIFICAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO INTESTINO DE CÃES COM E SEM LVC			
Duodeno			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	3,09 ± 0,78 ^{aB}	0,55 ± 0,23 ^{bB}	0,18 ± 0,16 ^{cA}
G2	5,86 ± 1,10 ^{aA}	1,14 ± 0,16 ^{bA}	0,24 ± 0,21 ^{cA}
G3	0,93 ± 0,11 ^{aC}	0,31 ± 0,25 ^{bB}	0,09 ± 0,04 ^{bA}
Jejuno			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	1,49 ± 0,58 ^{aB}	0,39 ± 0,11 ^{bA}	0,13 ± 0,08 ^{cA}
G2	4,68 ± 0,35 ^{aA}	0,44 ± 0,13 ^{bA}	0,14 ± 0,21 ^{cA}
G3	0,53 ± 0,30 ^{aC}	0,16 ± 0,10 ^{aB}	0,11 ± 0,04 ^{aA}
Íleo			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	1,84 ± 0,73 ^{aB}	0,42 ± 0,20 ^{bA}	0,16 ± 0,09 ^{cA}
G2	5,95 ± 0,58 ^{aA}	0,54 ± 0,38 ^{bA}	0,19 ± 0,12 ^{cA}
G3	0,76 ± 0,23 ^{aC}	0,27 ± 0,07 ^{bA}	0,11 ± 0,06 ^{cA}
Cólon			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	1,92 ± 0,74 ^{aB}	0,53 ± 0,47 ^{bA}	0,12 ± 0,09 ^{cA}
G2	2,91 ± 0,81 ^{aA}	0,47 ± 0,22 ^{bA}	0,19 ± 0,14 ^{cA}
G3	0,33 ± 0,29 ^{aC}	0,09 ± 0,04 ^{aB}	0,04 ± 0,04 ^{aA}

Nota: VCU: unidade de vilo-crípta; SM: submucosa; Mu: camada muscular. Comparação de médias pelo test (t). Intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Em colunas: proporções (a/b/c) idênticas com letras minúsculas não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Em linhas: proporções (A/B/C) idênticas com letras maiúsculas não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análises geradas pelo programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

Tabela 08. Número médio de mastócitos (MC) no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon) de cães do grupo controle (G3) e de cães com leishmaniose visceral (LV), em condições da presença de amastigotas de *L. infantum* no trato intestinal (G1) e na ausência do parasita no intestino (G2). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS NO INTESTINO DE CÃES COM E SEM LVC			
Duodeno			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	8,29 ± 0,69 ^{aB}	4,59 ± 1,28 ^{bB}	6,01 ± 0,85 ^{cB}
G2	14,15 ± 1,50 ^{aA}	8,21 ± 0,67 ^{bA}	8,69 ± 0,49 ^{bA}
G3	4,56 ± 0,33 ^{aC}	3,27 ± 0,58 ^{bB}	3,56 ± 0,50 ^{bC}
Jejuno			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	8,33 ± 1,02 ^{aB}	5,85 ± 0,88 ^{bB}	5,60 ± 0,92 ^{bB}
G2	15,19 ± 1,02 ^{aA}	13,12 ± 0,93 ^{bA}	8,76 ± 1,07 ^{cA}
G3	4,64 ± 0,34 ^{aC}	3,53 ± 0,35 ^{bC}	2,22 ± 0,33 ^{cC}
Íleo			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	6,81 ± 1,39 ^{aB}	3,14 ± 0,85 ^{bA}	3,58 ± 0,75 ^{b^{AB}}
G2	9,24 ± 0,94 ^{aA}	3,84 ± 1,16 ^{bA}	3,81 ± 0,77 ^{bA}
G3	2,69 ± 0,21 ^{aC}	2,67 ± 0,52 ^{aA}	2,53 ± 0,37 ^{aB}
Cólon			
GRUPOS	UVC Média ± DP	SM Média ± DP	Mu Média ± DP
G1	8,06 ± 1,52 ^{aB}	5,00 ± 0,53 ^{bB}	5,05 ± 0,99 ^{bA}
G2	10,61 ± 0,70 ^{aA}	6,07 ± 0,82 ^{bA}	5,81 ± 0,90 ^{bA}
G3	1,24 ± 0,53 ^{aC}	1,56 ± 0,42 ^{aC}	0,91 ± 0,60 ^{aB}

Nota: VCU: unidade de vilo-crípta; SM: submucosa; Mu: camada muscular. Comparação de médias pelo test (t). Intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Em colunas: proporções (a/b/c) idênticas com letras minúsculas não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Em linhas: proporções (A/B/C) idênticas com letras maiúsculas não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Análises geradas pelo programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

Tabela 09. Análise de correlação entre as células granulocíticas: neutrófilos (NEU), eosinófilos (EOS) e mastócitos (MAS) presente no intestino delgado (ID) e grosso (IG) de cães do grupo controle (G3) e de cães com leishmaniose visceral (LV), em condições da presença de amastigotas de *L. infantum* no trato intestinal (G1) e na ausência do parasita no intestino (G2). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Análise de correlação linear de Pearson entre as células granulocíticas								
Grupo	Célula	Região	Intestino Delgado			Intestino Grosso		
			NEU	EOS	MAS	NEU	EOS	MAS
G1 (N=8)	NEU	ID	1**	0,63	0,3	-0,58	0,71*	0,4
		IG	-0,58	-0,8*	-0,17	1**	-0,45	-0,27
	EOS	ID	0,63	1**	-0,02	-0,8*	0,75*	0,02
		IG	0,71*	0,75*	0,07	-0,45	1**	0,21
	MAS	ID	0,3	-0,02	1**	-0,17	-0,07	0,52
		IG	0,4	0,02	0,52	-0,27	0,21	1**
G2 (N=9)	NEU	ID	1**	0,23	0,33	0,18	0,06	0,1
		IG	0,18	-0,54	-0,09	1**	0,06	-0,02
	EOS	ID	0,23	1**	0,44	-0,54	0,43	0,71*
		IG	0,06	0,43	0,71*	0,06	1**	0,85**
	MAS	ID	0,33	0,44	1**	-0,09	0,71*	0,73*
		IG	0,1	0,71*	0,73*	-0,02	0,85**	1**
G3 (N=3)	NEU	ID	1**	0,86	-0,86	0,63	0,83	-0,97
		IG	0,63	0,15	-0,94	1**	0,95	0,8
	EOS	ID	0,86	1**	-0,49	0,75	0,44	-0,71
		IG	0,83	0,44	-1**	0,95	1**	0,94
	MAS	ID	-0,86	-0,49	1**	-0,94	-1**	-0,96
		IG	0,97	0,71	-0,96	0,8	0,94	1**

Nota: Coeficiente de Correlação linear de Pearson; (**) significativo a 1% ($p \leq 0,01$); (*) significativo a 5% ($p \leq 0,05$). Análises geradas pelo programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

Figura 07. Número médio de neutrófilos na mucosa intestinal do duodeno, jejuno, íleo e cólon dividido pelas regiões de vilosidade e criptas (VCU), submucosa (SM) e muscular (Mu) dos animais do grupo controle (G3) e dos animais com LVC, na condição da ausência do parasito no intestino (G2) e presença de amastigotas de *L. infantum* no intestino (G1). O desvio padrão da média esta representado pelas barras verticais acima das colunas. As letras indicam comparação de médias entre os grupos (G1, G2, G3) dentro de cada segmento intestinal, ($p \leq 0,05$). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

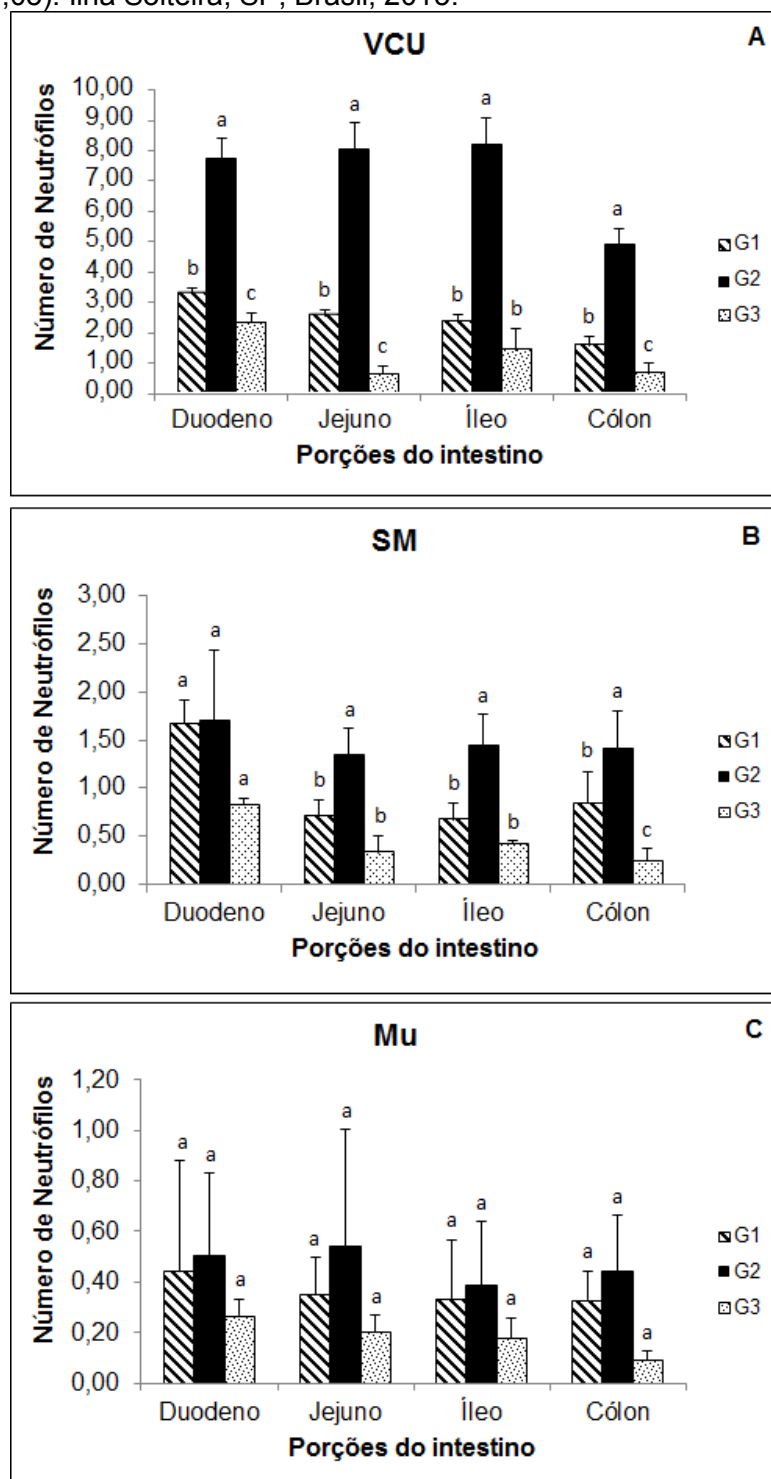


Figura 08. Número médio de eosinófilos na mucosa intestinal do duodeno, jejuno, íleo e cólon dividido pelas regiões de vilosidade e criptas (VCU), submucosa (SM) e muscular (Mu) dos animais do grupo controle (G3) e dos animais com LVC, na condição da ausência do parasito no intestino (G2) e presença de amastigotas de *L. infantum* no intestino (G1). O desvio padrão da média esta representado pelas barras verticais acima das colunas. As letras indicam comparação de médias entre os grupos (G1, G2, G3) dentro de cada segmento intestinal, ($p \leq 0,05$). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

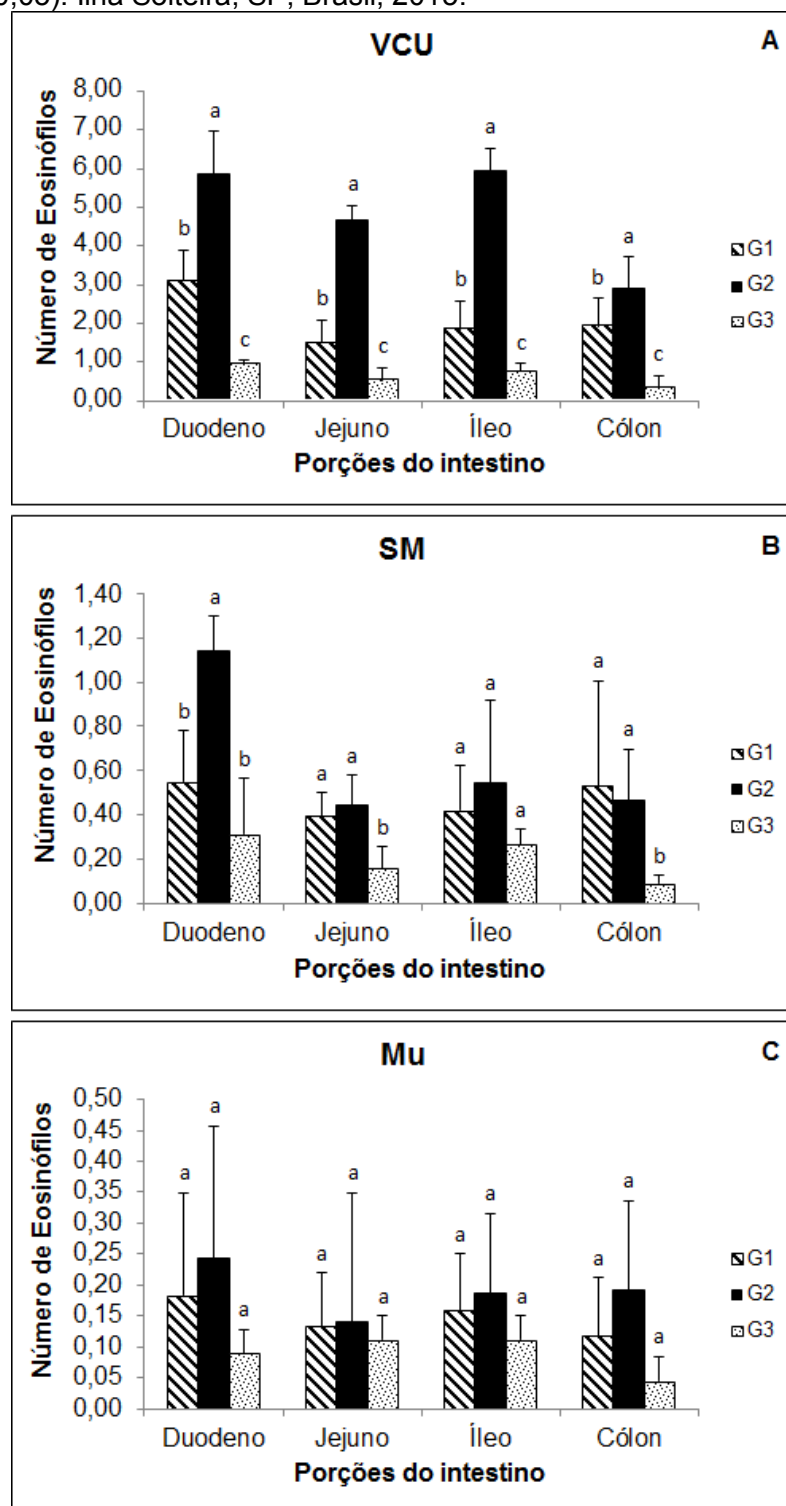


Figura 09. Número médio de mastócitos na mucosa intestinal do duodeno, jejuno, íleo e cólon dividido pelas regiões de vilosidade e criptas (VCU), submucosa (SM) e muscular (Mu) dos animais do grupo controle (G3) e dos animais com LVC, na condição da ausência do parasito no intestino (G2) e presença de amastigotas de *L. infantum* no intestino (G1). O desvio padrão da média esta representado pelas barras verticais acima das colunas. As letras indicam comparação de médias entre os grupos (G1, G2, G3) dentro de cada segmento intestinal, ($p \leq 0,05$). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

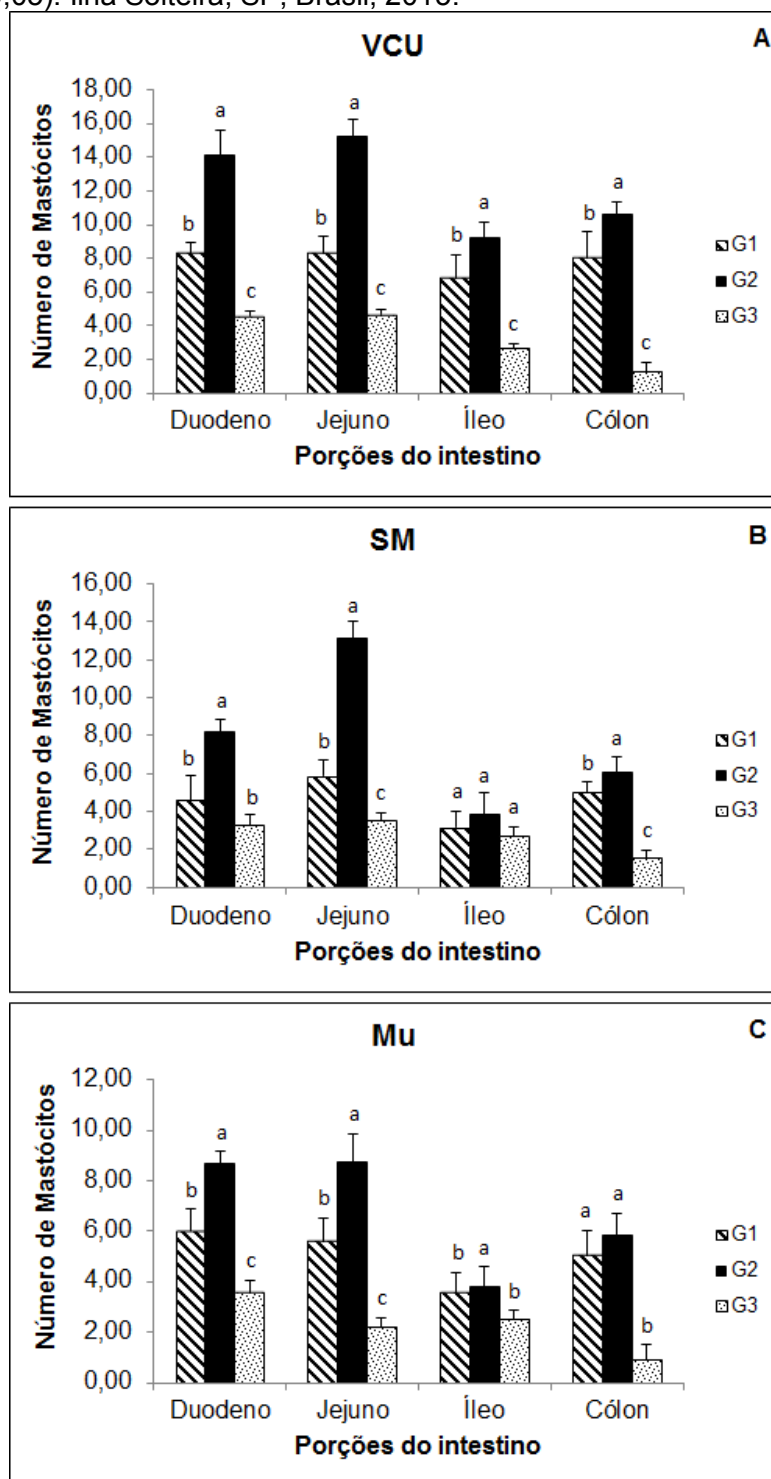


Figura 10. Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC, com ausência de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino. A: (cólon) na ponta das setas amarelas neutrófilos no interior de vasos presente na submucosa e entre as vilosidades, (objetiva 20x). B: (cólon) neutrófilos na ponta da seta amarela e dentro do círculo próximo a cripta (objetiva 40x). C: (duodeno), presença de eosinófilos na ponta dos vilos (ponta das setas brancas), (objetiva 40x); D: (duodeno), eosinófilos na base da cripta (ponta das setas brancas), (objetiva 100x). VCU = unidade de vilo/cripta; SM = submucosa; C = cripta; V =vilos. Coloração (A e B) = hematoxilina e eosina (HE); (C e D) = Azul de Astra e Direct red 75. Barras = 50 µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

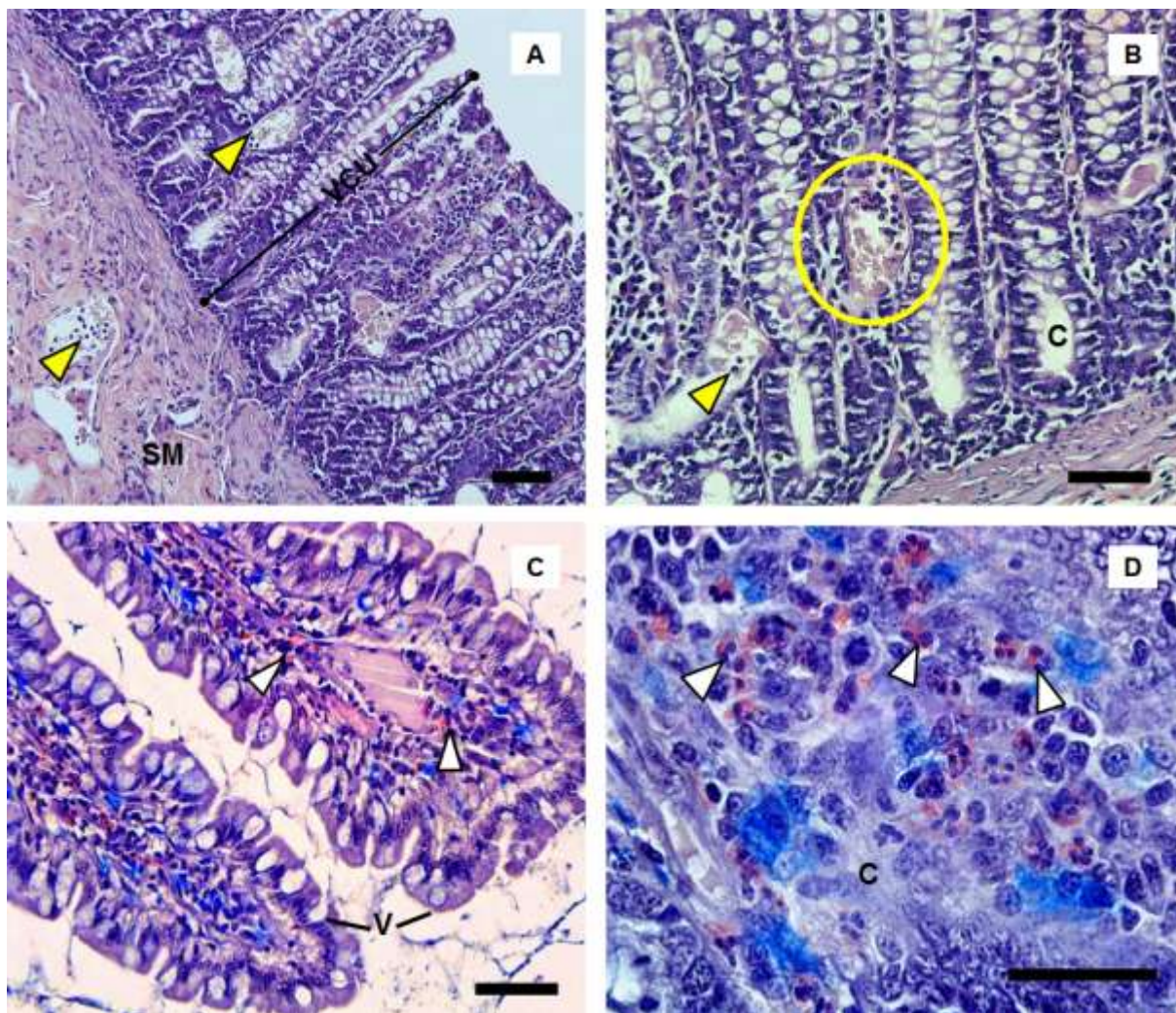
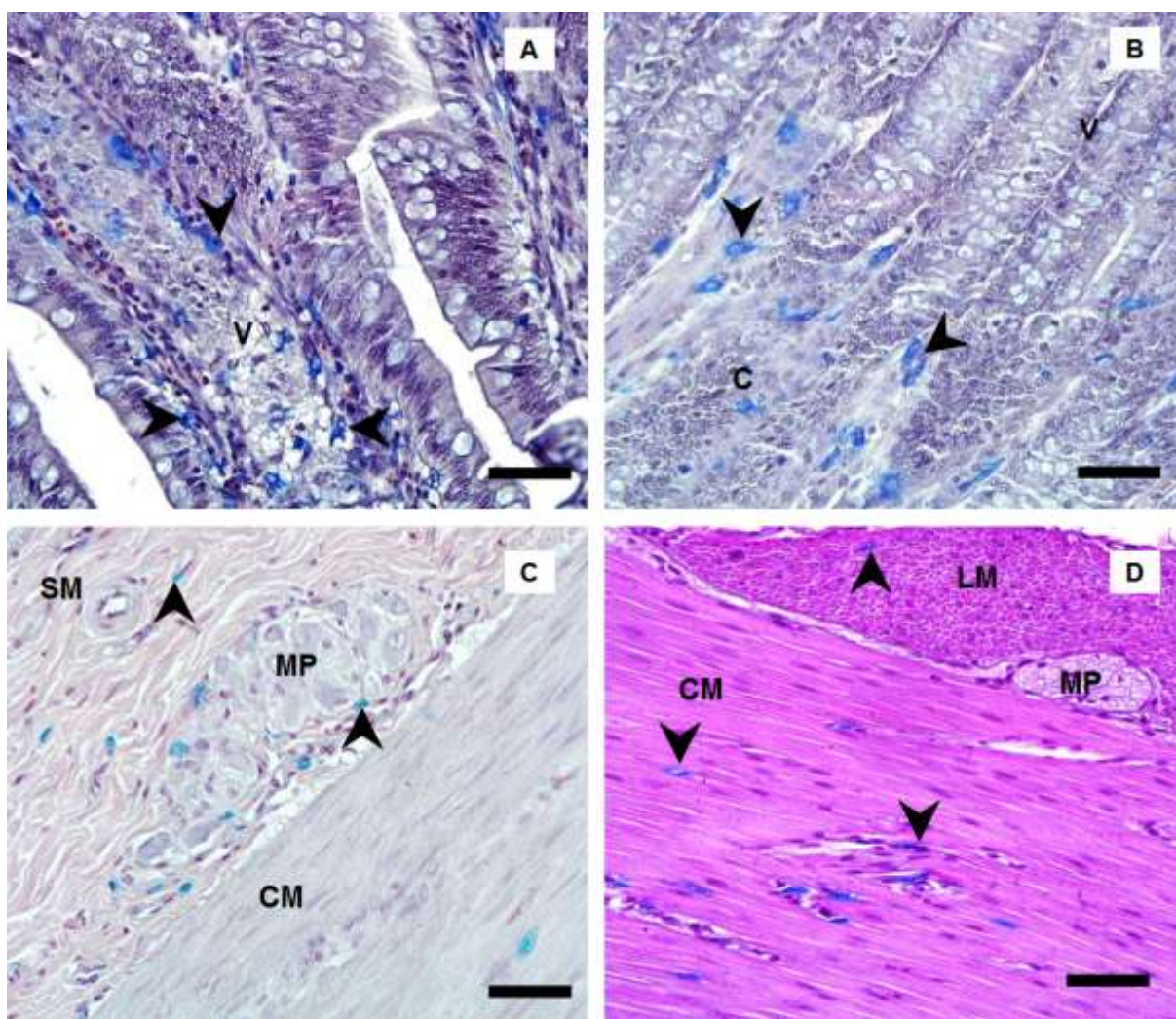


Figura 11. Fotos de secções histológicas do intestino de cães com LVC. A e B: em cães com ausência de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino (grupo G2); C e D: em cães com presença de amastigotas intestinais (grupo G1). A: (duodeno) mastócitos na ponta das setas pretas por toda a extensão do vilo. B: (cólon) mastócitos na ponta das setas pretas na base da cripta. C: (jejuno), presença de mastócitos na submucosa e associada ao plexo nervoso mioentérico. D: (jejuno) presença de mastócitos nas camadas de musculo liso tanto circular interno (CM), como longitudinal externo (LM). V = vilos; C = cripta; SM = submucosa; MP = plexo nervoso mioentérico; CM = túnica muscular circular interna; LM = túnica muscular longitudinal externa. Coloração = Azul de Astra e Direct red 75. Barras = 50 µm, objetiva (40x). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.



**CAPÍTULO 5 – AVALIAÇÃO DESCRITIVA DE LINFÓCITOS T (CD4⁺ e CD8⁺) E
MACRÓFAGOS NO INTESTINO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM
*Leishmania infantum***

**CHAPTER 5 – LYMPHOCYTE T (CD4⁺ and CD8⁺) AND MACROPHAGES
DESCRIPTIVE AVALIATION IN THE GUT OF DOGS NATURALLY INFECTED
WITH *Leishmania infantum***

AVALIAÇÃO DESCRITIVA DE LINFÓCITOS T (CD4⁺ e CD8⁺) E MACRÓFAGOS NO INTESTINO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum*

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi a realização de uma análise semiquantitativa sobre a presença de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e macrófagos no trato intestinal de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* com a presença ou ausência do parasito no intestino. Dos 13 cães avaliados, 10 foram diagnosticados positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) e eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, e três não tinham leishmaniose (grupo controle), mas vieram a óbito natural por acidentes em atropelamento no trânsito ou morte em procedimentos cirúrgicos. Todos os animais não apresentavam coinfeção parasitária com parasitos gastrintestinais, mediante exames coproparasitológicos realizados *in vivo* ou *pos-mortem*. Os cães foram divididos em três grupos de acordo com as seguintes características: grupo 01 (G1, n = 5) cães positivos para LVC e com amastigotas de *L. infantum* no intestino; grupo 02 (G2, n = 5) cães positivos para LVC, sem amastigotas intestinais; e, grupo 03 (G3, n = 3) cães negativos para LVC, grupo controle. A identificação das amastigotas do parasita no intestino e dos linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) foi por meio da imunistoquímica e a avaliação dos macrófagos foi por meio da histoquímica. A comparação estatística entre os grupos foi avaliada pelo teste de Duncan e, a análise de correlação foi de acordo com o teste de Spearman. De acordo com a análise de densidade celular, os linfócitos T CD4⁺ foram pouco expressivos nos três grupos avaliados, não apresentando diferença ($p \leq 0,05$) entre eles. No entanto, ocorreu aumento significativo de linfócitos T CD8⁺ e macrófagos no grupo G1 em relação aos grupos controles G2 e G3, principalmente nos órgãos mais infectados por amastigotas de *L. infantum*, como o duodeno e o cólon. Pela análise de correlação, observou-se que a intensidade parasitária por *L. infantum* no intestino grosso esteve correlacionada negativamente com as células T CD4⁺, e positivamente com os linfócitos T CD8⁺ e macrófagos. Em conclusão a não ativação/proliferação de linfócitos T CD4⁺ nos tecidos do intestino pode ter favorecido o desenvolvimento da doença, e a presença de células T CD8⁺ e macrófagos no intestino grosso dos cães do G1 associado ao alto parasitismo nesse órgão pode sugerir uma imunorregulação do hospedeiro por parte do parasita.

Palavras-chave: Células monocíticas. Leishmaniose. Trato intestinal.

**LYMPHOCYTE T (CD4⁺ and CD8⁺) AND MACROPHAGES DESCRIPTIVE
AVALIATION IN THE GUT OF DOGS NATURALLY INFECTED WITH *Leishmania*
*infantum***

ABSTRACT – The aim of this work was a semi-quantitative analysis about the presence of T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺) and macrophages in the intestinal tract of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* with the presence or absence of the parasite in the intestine. 13 dogs were used for this work, which, 10 were diagnosed positive for canine visceral leishmaniasis (CVL) and euthanized in the Zoonosis Control Center (CCZ) in Ilha Solteira, SP, Brazil, and three had no leishmaniasis (control group), but had natural death by accidents n in traffic trampling or in surgical procedures. All the animals did not show co-infection with other gastrointestinal parasites by fecal examinations *in vivo* or *post-mortem*. The dogs were divided into three groups according to the following characteristics: group 01 (G1, n = 5) were CVL positive dogs with *L. infantum* amastigotes in the intestine; group 02 (G2, n = 5) were LVC positive dogs without intestinal amastigotes; and group 03 (G3, n = 3) were CVL negative dogs, control group. The identification of the parasite amastigotes in the intestine and T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺) was by means of immunohistochemistry and the evaluation of macrophages was by histochemistry. The statistical comparison among groups was assessed by Duncan test, and the correlation analysis was according to the Spearman test. According to the cell density analysis, there was not statistical difference ($p \leq 0.05$) in numbers of CD4⁺ T lymphocytes among groups G1, G2 or G3. However, there was significant increase ($p \leq 0.05$) of CD8⁺ T lymphocytes and macrophages in group G1 in relation to G2 and G3 groups, mainly in duodenum and colon, which were the most infected organs by *L. infantum* amastigotes. For correlation analysis it was observed that the intensity of infection by *L. infantum* in the large intestine was negatively correlated with CD4⁺ T cells and positively with CD8⁺ T lymphocytes and macrophages. In conclusion, the absence of significant proliferation/activation of CD4⁺ T lymphocytes in the intestinal tissue may be favorable to the development of the disease, and the presence of CD8⁺ T cells and macrophages in the large intestine of G1 dogs associated with the high parasitic intensity suggests a possible immunoregulation by the parasite.

Key-words: Monocytic cells. Leishmaniasis. Intestinal tract.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma enfermidade parasitária crônica, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, espécie *L. infantum* que infectam macrófagos de uma grande variedade de mamíferos, incluindo o ser humano e o cão (DE LUCA et al., 1999; NIETO et al., 1999), assim como hospedeiros invertebrados pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (WHO, 2010), onde, a espécie *Lutzomyia longipalpis* têm sido incriminada como vetor da leishmaniose visceral na América (GALATI, et al., 1997).

A infecção no hospedeiro vertebrado é iniciada pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas com os protozoários do gênero *Leishmania* (WHEELER et al., 2011). Durante o repasto sanguíneo do inseto infectado, ocorre a inoculação da saliva, que irá modular a resposta imune local, bem como das formas promastigotas na pele do hospedeiro (CARVALHO, 2012). Quando as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos, elas se diferenciam rapidamente em formas amastigotas, com formato arredondado e sem flagelo (CARVALHO, 2012). Essa modificação é necessária para que os parasitas possam adaptar ao novo microambiente fagolisossomal (NADERER; MCCONVILLE, 2008).

Os protozoários do gênero *Leishmania* exibem um pronunciado tropismo por macrófagos, embora eles tenham a capacidade de infectar outras células fagocíticas ou não fagocíticas de mamíferos (NADERER; MCCONVILLE, 2008). Sendo assim, os macrófagos desempenham um papel importante no controle da infecção por *Leishmania*, e é um fato estabelecido que estas células possam participar da morte do parasita por mecanismos dependentes dos radicais livres oriundos da reação de oxigênio e do nitrogênio na explosão respiratória (RODRIGUES et al., 2007). Quando as formas promastigotas metacíclicas se ligam à superfície dos macrófagos, é desencadeado um fenômeno oxidativo celular, gerando metabólitos tóxicos de oxigênio, superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e, especialmente, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que tem sido responsabilizado pela principal atividade leishmanicida do macrófago (MURRAY, 1981; PEARSON et al., 1982). Além da resposta oxidativa, o macrófago possui outros mecanismos microbicidas, como é o

caso do óxido nítrico (NO), gerado a partir da reação do aminoácido L-arginina com o oxigênio molecular (O₂) (LIEW et al., 1990).

No entanto, é importante ressaltar que a sobrevivência dos parasitos na célula hospedeira depende da sua capacidade de evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado, e um desses mecanismos refere-se às atividades microbidas dos macrófagos (LAURENTI, 2010). Além disso, a dinâmica da *Leishmania* com os macrófagos envolve interação ligante-receptor entre as moléculas de superfície de ambos, seguida por uma série de reações bioquímicas que pode levar a ativação ou à inibição das funções microbidas da célula hospedeira (RITTING; BOGDAN, 2000).

Além dos macrófagos, as células T CD4⁺ também exercem importante função no controle da infecção por *Leishmania*. As células T CD4⁺ podem ser subdivididas em duas subpopulações: células T do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2). Vários fatores são apontados como responsáveis pelo padrão de diferenciação das diferentes subpopulações de células T CD4⁺, incluindo a genética do hospedeiro, a natureza do antígeno, o tipo de célula apresentadora de antígeno (APC), dentre outros (GUMY; LOUIZ; LAUNOIS, 2004). A diferenciação de células T CD4⁺ em Th1 ou Th2 parece ser profundamente influenciada pelas citocinas presentes durante a fase proliferativa inicial da ativação de células T. A presença de citocinas como IFN- γ e IL-2 tende a levar ao desenvolvimento de células Th1, que representa importante mecanismo de eliminação do parasito. De modo inverso, a presença de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 tende a levar ao desenvolvimento de células Th2, mostrando uma susceptibilidade à infecção (LIEW et al., 1990; LIEW et al., 1991; STENGER et al., 1994; GUMY; LOUIZ; LAUNOIS, 2004). A ativação do macrófago, através da resposta imune CD4 Th1, resulta na produção do óxido nítrico ("NO"), que juntamente com o stress oxidativo representa importante mecanismo de eliminação do parasito (LIEW et al., 1990; LIEW et al., 1991; STENGER et al., 1994).

Em cães infectados com *L. infantum*, ocorre uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ concomitante à proliferação do parasito nos macrófagos, o que sugere ausência de resposta imune efetiva no sentido de eliminar o parasito (BOURDOISEAU et al., 1997).

A perda das células T CD4⁺ permite que flebotomíneos durante a progressão da infecção no cão tenha maiores chances de infectar-se, e isso é indicativo de que a falta da capacidade de controlar o parasitismo permite ao animal a disseminação do parasita para outros tecidos, aumentando a carga parasitária (ALVAR et al., 2004).

Essa imunossupressão é uma consequência, em parte, da diminuição de células T CD4⁺. Portanto, o grande número de parasitos observados no baço pode ser uma consequência de uma disfunção imunológica, permitindo a multiplicação e disseminação do parasita para vários órgãos incluindo estômago, intestino e pulmão (HERVÁS et al., 1996).

Os linfócitos T CD8⁺ estão subdivididos em linfócitos T citotóxicos 1 (Tc1) e T citotóxicos 2 (Tc2). As células Tc1 são capazes de destruir células infectadas por meio de perforinas e/ou de mecanismos associados à expressão de Fas/CD95L que inicia o processo de apoptose via ativação da caspase 8, e, uma forte produção de IFN- γ e TNF- α ; enquanto que as Tc2 destroem microrganismos intracelulares pela via das perforinas e granzimas, sendo capazes de produzir principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 (DOBRZANSKI et al., 2004).

Na infecção com *L. major* foi demonstrado que as células T CD8⁺ estão relacionadas com a eliminação do parasita e com o estabelecimento e a manutenção da imunidade contra a infecção. Assim, as células T CD8⁺ participam diretamente na produção de IFN- γ e na regulação da produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ (MÜLLER et al., 1991; HERATH; KROPF; MÜLLER, 2003).

Amastigotas de *Leishmania* spp. intramacrofágica já foram registradas no trato gastrointestinal de cães infectados experimentalmente por Keenan et al. (1984); Chiapella, et al. (1986) e, estiveram associadas a lesões inflamatórias Gonzáles et al. (1990). Recentemente Pinto et al. (2011) descreveram as reações crônicas inflamatórias intestinais compostas principalmente por macrófagos, plasmócitos, linfócitos e raros neutrófilos em cães com LVC, clinicamente assintomáticos.

Embora haja estudos que relatam o encontro de amastigotas de *Leishmania* no trato intestinal, nenhum estudo descritivo sobre a densidade de células imune efectoras, como os linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos foram realizados nesse órgão, justificando de tal maneira o objetivo deste estudo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e Local

Para este estudo foram avaliados 13 cães provenientes dos municípios de Ilha Solteira e Andradina, localizados na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. Desses animais, 10 foram diagnosticados positivos para LVC e eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, e três não tinham leishmaniose (grupo controle), mas vieram a óbito natural por acidentes em atropelamento no trânsito ou morte em procedimento cirúrgico. Todos os animais não apresentavam coinfecção parasitária com parasitos gastrintestinais, mediante aos exames coproparasitológicos realizados *in vivo* ou no *post-mortem* conforme descrito no Capítulo 2, item 2.9.

Este trabalho teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS-Unesp), Departamento de Biologia e Zootecnia, sob expedição do protocolo nº 06/2014-CEUA.

2.2 Diagnóstico para LVC e eutanásia

Os cães foram diagnosticados com LVC durante o inquérito epidemiológico da doença no município de Ilha Solteira, realizado pelo CCZ da cidade. A condição para o diagnóstico seguiu os procedimentos descritos no Capítulo 2, item 2.3.

Os animais diagnosticados positivos foram submetidos à eutanásia obedecendo ao Decreto nº 51.838 do Ministério da Saúde, Brasil, conforme procedimentos aprovados pela resolução 1000/2012 do CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária).

2.3 Coleta e preparo das amostras teciduais

Após a constatação do óbito, amostras de fezes e conteúdo do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) e grosso (cólon ascendente) foram coletadas,

identificadas, acondicionadas em gelo e enviadas ao laboratório para análises coproparasitológicas.

Fragmentos dos tecidos intestinais foram coletados (0,5 a 1 cm) e fixados em solução formalina tamponada a 10% (tampão fosfato 0,01M) por 24 horas. Após, os tecidos foram lavados com álcool 70% e desidratados através de passagens sucessivas em etanol 70%, 80%, 90% e 100%. Posteriormente, realizou-se a diafanização do tecido, a impregnação com parafina e a formação dos blocos. Em seguida os blocos foram congelados a -20°C e então submetidos à secção de cortes em micrótomo (5 µm) para montagem das lâminas histológicas.

2.4 Histoquímica

As lâminas com cortes histológicos foram submetidas à técnica padrão de histologia e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação dos macrófagos infectados e não infectados com *L. infantum*. Por essa técnica três secções de cada tecido intestinal foram avaliadas sob um microscópio óptico, objetiva 40 e/ou 100 vezes.

2.5 Imunoistoquímica

Para a realização da técnica imunoistoquímica as secções teciduais foram previamente hidratadas em passagens sucessivas em xilol e álcool etílico. Inicialmente a enzima peroxidase endógena foi bloqueada usando-se a solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% diluído em 0,01M de solução salina fosfatada tamponada (PBS) com pH=7,4 e as reações inespecíficas do anticorpo secundário foram inibidas usando-se o soro normal do animal que produziu o anticorpo secundário(soro de cabra) na diluição 1/50. O anticorpo primário foi incubado sobre o tecido a ser analisado em câmara úmida a 4° C “*over night*”. Após três enxágues em PBS, o anticorpo secundário foi aplicado e incubado por 1 hora à temperatura ambiente, e após sucessivos enxágues foi aplicado sobre os tecidos o complexo “Avidin-Biotin Peroxidase” (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) que possibilitou a detecção da reação imunológica. Após três enxágues

em PBS, foi colocado sobre cada secção tecidual em torno de 50 a 100µL da solução preparada a fresco de substrato cromógeno específico para peroxidase (Substrato VECTOR® NovaRED™) e deixado este reagir por 5 minutos. Após, outro enxágue, mas em água destilada, os tecidos foram contra corados pela hematoxilina de Mayer, desidratados e montados em bálsamo do Canadá entre lâmina e lamínula.

Como controle da reação, uma lâmina em cada bateria não recebeu o anticorpo primário. Duas lâminas para cada grupo de animal foram analisadas e os tecidos de cães sadios foram testados como controle negativo e os sabidamente positivos para LVC intestinal foram os controles positivos da reação.

Para coloração das formas amastigotas de *L. infantum*, foi adotado o procedimento de Tafuri et al. (2004) com algumas modificações, tais quais: anticorpo primário proveniente do soro hiperimune de cães naturalmente e comprovadamente infectados com *L. infantum* (diagnosticado pelo ELISA e RIFI; com título = 1:2560), e anticorpo secundário o anti-IgG biotinilado de coelho produzida em cabra (reação imunológica cruzada com cães), utilizado na diluição 1:500.

Para a detecção de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, foi necessário fazer a recuperação antigênica dos tecidos em tampão TRIS, (pH=7,6) + enzima tripsina (1:250). Logo após, os tecidos foram preparados para bloqueio da peroxidase endógena e o bloqueio dos sítios inespecíficos, conforme descrito acima. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-cão produzidos em rato: o anti-CD4 (AbD serotec – MCA1038GA, Bio-Rad Laboratories) e o anti-CD8 (AbD serotec – MCA1039GA, Bio-Rad Laboratories), ambos diluídos 1:50. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo secundário biotinilado anti-rato, produzido em cabra (AbD serotec – STAR131B, Bio-Rad Laboratories), diluído 1:200, que reagiram especificamente com os respectivos anticorpos primários.

2.6 Grupos experimentais

Os cães foram divididos em três grupos, conforme descrito no capítulo 2, item 2.11 deste trabalho. Onde, grupo um (G1): cães com LVC, e parasitados no intestino com amastigotas de *L. infantum* (n = 5); grupo dois (G2): cães com LVC, porem sem

a presença do parasita *L. infantum* intestino (n = 5); e o grupo três (G3): cães negativos para LVC (n = 3, grupo controle). A identificação das amastigotas de *L. infantum* foi realizada pela técnica de imunoistoquímica.

2.7 Semiquantificação das células imunomarcadas

2.7.1 Amastigotas de *L. infantum*

A contagem de formas amastigotas de *L. infantum* foi realizada somente nas lâminas positivas pela imunoistoquímica em 100 campos visuais na objetiva de 40 vezes (40x). O grau parasitário foi determinado pelo número de células infectadas pelos parasitas, da seguinte forma: nenhuma amastigota (negativo); levemente parasitado com 1-50 células (escore 1 +); medianamente parasitado, com 51-100 células (escore 2 ++); intensamente parasitado, com 101-200 células, (escore 3 +++); e muito intensamente parasitado, ou seja, acima de 201 células, (escore 4; ++++).

2.7.2 Linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos

Para análise semiquantitativa das células linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e macrófagos foram analisados 100 campos visuais na objetiva de 40 vezes (40x). O escore da densidade celular foi determinado pelo número de campos visuais onde cada tipo celular foi visualizado, como por exemplo: presença das células em 0 ≤ 25 campos (escore 01 +); > 25 ≤ 50 campos (escore 02 ++); > 50 ≤ 75 campos (escore 03 +++); > 75 (escore 04 ++++).

2.8 Delineamento estatístico

Os escores médios das análises semiquantitativas das células linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e macrófagos dos grupos experimentais (G1, G2 e G3) foram comparados estatisticamente pelo teste de Duncan. Para a análise de correlação entre as células e a intensidade parasitária por amastigotas de *L. infantum*, utilizou-se o teste de correlação de Spearman. Em ambos os testes respeitou-se o intervalo

de confiança de 95% onde valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente. Todas as análises foram geradas no programa R, versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2015).

3 RESULTADOS

Dos 13 cães avaliados neste estudo, 76,9% (10/13) eram positivos e sintomáticos para LVC e, de acordo com as análises histológicas 38,45% (5/13) apresentavam formas amastigotas de *L. infantum* em pelo menos uma porção do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon ascendente) e, esses animais foram classificados no grupo 01 (G1) (Tabela 10). Destes cães, dois deles, estavam positivos com intensidades parasitárias de intensa a muito intensa em todos os órgãos intestinais analisados, embora na média dos escores, não se tenha observado diferença significativa na análise comparativa entre os órgãos e entre os animais. Dois animais apresentaram-se positivos apenas no cólon e este foi o órgão mais frequentemente infectado em relação aos outros estudados (Tabela 10).

Na mesma proporção, 38,45% (5/13) dos cães não apresentaram formas do protozoário no intestino apesar de serem positivos para LVC e foram classificados no grupo 02 (G2) e, três animais negativos para a doença compuseram o grupo controle (G3).

A análise semiquantitativa das células monocíticas (linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e macrófagos) e das amastigotas de *L. infantum* foi realizada somente na mucosa intestinal (UVC) e comparada entre os grupos experimentais avaliados.

3.1 Linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$

Os linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) foram avaliados qualitativamente e semiquantitativamente na mucosa intestinal, representada pela unidade vilo/cripta (UVC), nos três segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) e no intestino grosso (cólon ascendente). A avaliação qualitativa dos linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) foi

realizada de acordo com a imunomarcação dessas células nos tecidos, onde a membrana celular corou na cor marrom avermelhada.

Nos animais do grupo G1, onde as formas amastigotas do protozoário *L. infantum* estava presente, os linfócitos T CD4⁺ imunomarcados apresentavam-se em menor quantidade (Figuras 12 A, C e E) quando comparados com as mesmas regiões imunomarcadas para linfócitos T CD8⁺ (Figuras 12 B, D e F). Assim também ocorreu com os animais do grupo G2. De acordo com a Figura 13 (A, C e E) os linfócitos T CD4⁺ nos tecidos de animais do grupo G2 também foram inferiores em relação ao número de linfócitos T CD8⁺ (Figuras 13 B, D e F).

Em secções histológicas do intestino delgado (íleo) de um cão do grupo G1 que se apresentava intensamente infectado por amastigotas de *L. infantum* (escore 4, +++) foi registrado um moderado acúmulo de células monocíticas na submucosa, sugerindo um processo inflamatório no local, e os linfócitos T CD8⁺ predominavam a área (Figura 14 B), enquanto os linfócitos T CD4⁺ quase não foram imunomarcados (Figura 14 A). Nas placas de Peyer do íleo (Figuras 13 C e D) e do cólon (Figuras 14 C e D) é notável o grande número de células linfocitárias, e novamente os linfócitos T CD8⁺ apresentaram-se aumentados entre os tipos celulares (Figuras 13 D e Figura 14 D).

De acordo com a Tabela 10, o cólon foi o segmento intestinal mais parasitado, com escore variando de 3 (+++) a 4 (+++++) quanto a intensidade parasitária, e em concordância, esse segmento do intestino apresentou elevado escore para a presença de linfócitos T CD8⁺, e baixo escore para linfócitos T CD4⁺ (Tabela 11 e 12). Ainda na Tabela 12, o duodeno e o cólon do grupo G1 foram semelhantes estatisticamente quanto à presença de linfócitos T CD8⁺, porém diferiram ($p \leq 0,05$) dos outros segmentos do mesmo grupo (jejuno e íleo do G1) e também de todos os segmentos dos grupos G2 e G3. Já nos animais do grupo G2, o número de linfócitos T CD8⁺ em todos os segmentos foi significativo ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (G3).

Contudo, ao comparar o quadro geral dos dados semiquantitativos de linfócitos TCD4⁺ entre os grupos G1, G2 e G3 não foi possível observar diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade entre os grupos (Figura 15), assim também aconteceu para a análise individual dos segmentos do trato intestinal

(duodeno, jejuno, íleo e cólon), embora o cólon e o jejuno dos animais do grupo G2 tenham apresentado um leve aumento no número de CD4⁺ (Tabela 11 e Figura 15). Entretanto, para linfócitos TCD8⁺, os grupos G1 e G2 apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (G3) (Figura 16).

3.2 Macrófagos

Por este estudo verificou-se que os macrófagos estavam distribuídos por toda a lâmina própria da mucosa intestinal, assim como na submucosa, porém, a análise semiquantitativa realizada na mucosa (unidade de vilo e cripta - UVC) apresentou diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos G1, G2 e G3, conforme demonstrado na Tabela 13 e Figura 17.

De acordo com a Tabela 13, os cães do grupo G1 apresentaram escores para quantidade de macrófagos variando de 2 (++) a 4 (++++). No entanto, nesse grupo obviamente, os mais altos escores foram verificados nos animais com maior intensidade parasitária, como pode ser comparado com os dados da Tabela 10, onde duodeno e cólon diferiram estatisticamente dos animais dos grupos G2 e G3, em relação à hiperplasia de macrófagos observada no G1. Já os cães do G2, embora com aumento de macrófagos em relação ao grupo G3, a maioria dos animais e dos segmentos intestinais apresentaram escore 2 (++) . Na análise estatística, apenas o duodeno do grupo G2 diferiu dos do grupo controle (G3). A análise semiquantitativa de macrófagos revelou que o duodeno e o cólon diferiram entre os grupos (G1, G2 e G3), mas jejuno foi o único que não diferiu, lembrando que o jejuno foi o segmento menos parasitado (Tabela 10).

Na Figura 18 (A, C e E) estão representados macrófagos presente entre as criptas e submucosa do intestino grosso de cães do grupo G2, com aspectos normais e sem parasitas. Em contra partida, na Figura 18 (B, D e F) também no intestino grosso, porém de cães do grupo G1 estão representados macrófagos hipertróficos e repletos de amastigotas de *L. infantum* em seu interior. Simultânea à presença de parasitas nos animais do grupo G1, o número de macrófagos aumentou também.

3.3 Análises de correlação

As análises de correlação foram geradas a partir do método estatístico de Spearman. Para isso, foram correlacionados os escores para intensidade parasitária por amastigotas de *L. infantum*, células linfocitárias do tipo CD4⁺ e CD8⁺ e macrófagos.

Na Tabela 14, no grupo G1, na região do intestino grosso, observou-se que a intensidade parasitária e os linfócitos T CD4⁺ apresentaram correlação inversa significativa ($p \leq 0,05$), ou seja, o tecido com elevado escore parasitário apresentavam escores reduzidos para de linfócitos T CD4⁺ ($p = -0,89$). Assim também ocorreu para as análises de correlação entre os linfócitos T CD4⁺ com linfócitos T CD8⁺ e macrófagos ($p = -0,89$ e $p = -0,92$) respectivamente na mesma região dos animais do grupo G1.

Diferentemente os linfócitos T CD8⁺ e macrófagos se correlacionaram positivamente entre si no intestino grosso do grupo G1 ($p = 0,97$), e no intestino delgado do grupo G2 ($p = 0,89$) (Tabela 14). Ambos os tipos celulares (CD8⁺ e macrófagos) também se correlacionaram positivamente ao nível de significância de 5% com o escore parasitário encontrado no intestino grosso ($p = 0,91$ e $p = 0,88$) respectivamente (Tabela 14). No intestino delgado, não se observou correlação estatística entre os escores parasitários e as células aqui estudadas para os animais do grupo G1.

4 DISCUSSÃO

As leishmanioses ainda são um desafio para a saúde pública, visto que as medidas de controle da doença não são eficazes e existe uma grande parte da população (humana e canina) que vive em áreas endêmicas sob o risco de adquirir a doença (CARVALHO, 2010). Devido ao grande número de casos caninos com LVC, muitos estudos surgiram nos últimos anos e, em especial, no que diz respeito aos mecanismos imunológicos induzidos pela infecção por *Leishmania*. Neste trabalho propôs-se avaliar a presença dos linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos em tecidos

do intestino de cães com leishmaniose frente a presença e/ou ausência do protozoário nesses tecidos.

A imunidade mediada por células tem um papel importante no controle da *Leishmania* em relação ao hospedeiro. Muitas subpopulações celulares estão envolvidas na resposta imune a esse parasita, incluindo linfócitos que são ativados por citocinas inflamatórias e que irão atuar em conjunto com outras células (ABBAS; LICHTMAN, 2003), como por exemplo, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, estudados neste trabalho.

Para Bourdoiseau et al. (1997), os cães infectados com *L. infantum* apresentaram uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ e a concomitante proliferação do parasito nos macrófagos, sugerindo a ausência de uma resposta imune efetiva no sentido de eliminar o parasita. Corroborando com esses dados, neste trabalho, observou-se um elevado número de parasitas na mucosa (vilos e criptas) e submucosa dos cães do grupo G1 e, ao mesmo tempo, não se verificou aumento significativo de células T CD4⁺, demonstrando assim, uma correlação inversa em relação à intensidade parasitária. Para Alvar et al. (2004) a redução das células T CD4⁺ permite que flebotomíneos durante a progressão da infecção no cão tenham maiores chances de infectar-se, e isso é indicativo de que a falha do hospedeiro em controlar o parasitismo favorece a disseminação do parasita para outros tecidos, aumentando a carga parasitária.

Ainda com relação aos linfócitos T CD4⁺ não se observou diferença significativa entre os animais dos grupos G1, G2 e G3, nas quantidades deste tipo celular ($p \leq 0,05$), porém, nos grupos de cães com LVC (G1 e G2), somente os cães do grupo G1 apresentaram o trato intestinal infectado pelo parasita, demonstrando maior susceptibilidade desses animais na região intestinal, possivelmente uma resposta mais polarizada para os linfócitos CD4⁺ do tipo Th2 do que Th1. De acordo com Pinelli et al. (1994), os cães que desenvolvem a LVC de forma severa e progressiva. A doença está associada com uma resposta do tipo Th2, predominantemente imune-humoral, sendo incapazes de conter a infecção. Da mesma forma, em outros estudos realizados em ratos infectados com *L. major* no tecido subcutâneo tem demonstrado que as células Th1 produtoras de IFN- γ eram essenciais para controlar a infecção por *L. major*, e que a incapacidade de

desenvolver uma resposta Th1 resultou na susceptibilidade à doença. Por isso, foi concluído de que se o rato gerasse uma resposta por Th2, isso levaria à susceptibilidade; em contraste, se fosse por Th1, a resposta imune gerada controlaria com sucesso a infecção sem mesmo a ajuda de células T CD8⁺ (STÄGER; RAFATI, 2012). Além disso, Carvalho (2012) observou que camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *L. (Leishmania) amazonensis* apresentaram resposta celular do tipo Th2 e esteve relacionada à susceptibilidade do hospedeiro ao parasita. Já a infecção experimental de camundongos também da linhagem BALB/c por *L. (Vianna) brasiliensis* desencadeou no hospedeiro uma resposta imune celular do tipo Th1, ligada a resistência contra o parasita. Esses estudos demonstraram também que a espécie de parasita também está relacionada com o tipo de resposta imune a ser desenvolvida.

Com base nas informações acima, levantou-se a hipótese de que os animais do grupo G1 poderiam estar apresentando uma resposta imune humoral do tipo Th2, favorecendo assim o estabelecimento da infecção. Enquanto nos cães do grupo G2, a resposta seria do tipo celular mediada por Th1, ou seja, mais efetiva no sentido de eliminar ou evitar o estabelecimento do parasita no intestino, embora ambos os grupos G1 e G2 eram animais sintomáticos para LVC. É possível que os cães do grupo G2 ou estivessem no início da infecção intestinal, ainda não detectável pelos métodos utilizados ou se recuperaram da infecção intestinal, apresentando uma resposta imune mais efetiva via Th1, por meio da liberação de citocinas (IFN- γ e TNF) em associação com CD8⁺. Entretanto, nos cães do grupo G1, o parasita poderia estar promovendo uma imunorregulação favorável à sua presença, replicação e sobrevivência no órgão, caracterizando uma resposta do tipo Th2.

No entanto, há carência de estudos sobre resistência ou susceptibilidade à leishmaniose intestinal em cães e por ser o intestino um órgão com características anatômicas, fisiológicas e neurofisiológicas particulares não se pode extrapolar dados obtidos de pesquisas realizadas em outros órgãos como pele, baço, linfonodo ou fígado, pois como se sabe, em estudos com helmintos gastrintestinais, uma resposta imune do tipo Th2 levaria à expulsão do parasita ocasionando uma resistência do hospedeiro (WAKELIN, 1996). Além disso, como as citocinas não

foram avaliadas na presente pesquisa, não foi possível afirmar se a resposta imune contra as amastigotas intestinais foi do tipo humoral (Th2) ou celular (Th1).

Os linfócitos T CD8⁺ também foram analisados na presente pesquisa, pois têm demonstrado desempenhar um papel importante na imunidade protetora a uma ampla variedade de agentes patogênicos, incluindo os vírus, bactérias e protozoários parasitas. No entanto, o papel protetor das células T CD8⁺ durante infecções por *Leishmania* têm sido controverso, principalmente por causa da discrepância entre as infecções por diferentes espécies de *Leishmania*. Cada espécie pode apresentar um tropismo diferente e, sua diversidade se reflete nas várias manifestações clínicas que elas induzem (STÄGER; RAFATI, 2012).

Dessa forma, Ahmed et al. (2003) por meio de infecção intradérmica de *L. infantum* em ratos, demonstraram que as células T CD8⁺ participavam do controle desses parasitas na pele. Outro estudo mostrou também que as células T CD8⁺ obtidas de ratos infectados com *L. infantum* expressavam IFN- γ e TNF, e exibiam atividade citotóxica contra células expressando antígenos de *Leishmania* (TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2003). No presente estudo, os linfócitos T CD8⁺ estavam intensamente aumentados e correlacionados positivamente com a intensidade parasitária nos tecidos intestinais dos animais do grupo G1. Embora presentes, de uma forma moderada também nos animais do grupo G2, houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) nos segmentos intestinais onde havia intenso parasitismo por amastigotas, como duodeno e cólon, porém nos outros segmentos (jejuno e íleo) não houve diferença. No entanto, ambos os grupos (G1 e G2) apresentaram escores mais elevados e estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) para esse tipo celular em relação aos animais controles (grupo G3).

Sabidamente, os cães do grupo G1 eram sintomáticos para a doença LVC, e a hiperplasia de linfócitos T CD8⁺ nos tecidos do trato intestinal dos animais deste grupo não foi suficiente para diminuir a intensidade da carga parasitária. Tentando descobrir o papel de células efectoras no controle de leishmaniose, Ruitenber et al. (2001) observaram a ativação de linfócitos T em células mononucleares do sangue periférico de cães assintomáticos após estímulo específico *in vitro* com antígenos de *L. infantum*, resultando na produção de IFN- γ e na indução da atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ com consequente lise de macrófagos infectados por

Leishmania. Por outro lado, os cães sintomáticos apresentaram queda na população de linfócitos T CD4⁺, linfócitos B CD21⁺ e redução na resposta linfoproliferativa *in vitro* frente ao estímulo antigênico-específico, sem produção significativa de IFN- γ e, conseqüentemente, menor capacidade da lise de macrófagos infectados por linfócitos T CD8⁺. Como na presente pesquisa, houve correlação positiva e significativa entre a intensidade parasitária e as células T CD8⁺, mas não com as células T CD4⁺ no trato intestinal dos cães do grupo G1, acredita-se que uma reação imune mediada somente por CD8⁺ não foi suficiente para controlar a infecção intestinal por amastigotas, pela possível incapacidade destas células exercerem suas atividades citotóxicas sobre os macrófagos infectados, como verificado nos experimentos *in vitro* realizados por Ruitenberg et al. (2001),

No entanto, não se pode afirmar na presente pesquisa que os linfócitos T CD8⁺ em cães sintomáticos para LVC estivessem relacionados com a susceptibilidade do hospedeiro favorecendo o parasitismo, pois estas células também se encontravam aumentadas em segmentos intestinais dos animais do G1 com ausência do parasita. Com relação aos cães do grupo G2, possivelmente, a presença dos parasitas em outros órgãos como fígado, baço, medula óssea, não necessariamente no intestino, ou uma infecção intestinal não parasitária por bactérias oportunistas, poderia estar sensibilizando o sistema imunológico levando-o à proliferação de células efetoras como linfócitos T CD8⁺ no trato intestinal dos cães desse grupo. No caso das mucosas, é sabido que, quando um local está infectado/inflamado, há uma proliferação de células mediadoras-efetoras e a subsequente migração para outros locais, protegendo mucosas de órgão mais distantes (SIMECKA, 1998). A ausência de diferença significativa ($p \leq 0,05$), no íleo e jejuno, dos cães dos grupos G1 e G2 em relação às células CD8⁺ poderia também ser explicada pelos elevados escores para esse tipo celular encontrado no animal nº 1 do grupo G2, elevando a média. Mas no geral os escores de CD8⁺ nos animais do G1 foram superiores em todos os órgãos analisados, principalmente no cólon, local mais parasitado do grupo G1.

Stäger; Rafati (2012) relataram que as células T CD8⁺ não poderiam ser meramente participantes da resposta imune primária através da secreção de IFN- γ e, eventualmente, destruir células alvo que estivessem infectadas, mas poderiam

estar envolvidas também no recrutamento de outras células inflamatórias e na manutenção de granulomas. De fato, um estudo utilizando *L. infantum* demonstrou que as células T CD8⁺ expressavam RANTES e MIP-1 α (TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2003), duas quimiocinas envolvidas no recrutamento de linfócitos T para o local de inflamação e na formação e manutenção de granulomas (MACKAY, 2001). Em outra pesquisa, ficou demonstrado que a redução de células T CD8⁺ resultava na formação de granulomas deficitários e, finalmente, na exacerbação da doença (STERN et al., 1988). No presente estudo, notou-se a formação de granulomas com formas amastigotas no seu interior, principalmente na submucosa do cólon de alguns cães do G1, e nesses granulomas havia a predominância de linfócitos T CD8⁺ com grande quantidade também de macrófagos e plasmócitos e raros neutrófilos. Além disso, evidenciou-se a presença dos parasitas em placas de Peyer e nestas notou-se a presença dos linfócitos T CD8⁺, localizados mais periféricamente e em maior quantidade do que CD4⁺.

Embora, linfócitos CD8⁺ estivessem aumentados na infecção intestinal por *Leishmania*, estas células não pareciam ter desempenhado seu papel protetor na eliminação do parasita. Alguns estudos tem mostrado que apesar das células T CD8⁺ participarem na resposta imune à infecção por *L. donovani* e *L. infantum*, Joshi et al. (2009) verificaram que a *L. donovani* induzia respostas antígeno-específicas defeituosas das células T CD8⁺, e como consequência não conseguiam exercer eficientemente seu potencial citotóxico contra as células infectadas. Outros estudos relataram que ratos infectados com *L. donovani* geravam respostas de células T CD8⁺ com a expansão clonal limitada. A extensão da expansão clonal é um mecanismo correlacionado com a eficácia na eliminação de agentes patogênicos (BADOVINAC; HARING; HARTY, 2007). Contudo, a respeito das células T CD8⁺ apesar de existir inúmeros estudos relacionados com diferentes espécies do gênero *Leishmania*, não existe um padrão de resposta estabelecido no que cerne ao envolvimento destas células frente a este protozoário, e que cada espécie pode modular uma resposta diferente, carecendo de estudos mais específicos para essa relação.

O aumento de macrófagos em cães com LVC pode ser observado nos cães dos grupos G1 e G2. A análise semiquantitativa demonstrou que os cães do grupo

G1 apresentavam hiperplasia deste tipo celular, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos grupos G2 e G3, principalmente no duodeno e no cólon. Concomitantemente, os cães do grupo G2 também foram significativos ($p \leq 0,05$) pelo número de macrófagos em relação ao controle (G3). No caso dos cães do grupo G1, foram observados macrófagos hipertróficos repletos de amastigotas de *L. infantum* intracelular. No passado Keenan et al. (1984); Chiapella, et al. (1986) e Gonzáles et al. (1990) também observaram amastigotas de *Leishmania* spp. intramacrofágica em infecções experimentais em cães. Anderson et al. (1980) observaram a hiperplasia dessa célula na lâmina própria e submucosa do estômago, duodeno, jejuno, íleo e cólon de um cão com LVC, e Pinto et al. (2011) revelaram imunoistoquimicamente macrófagos infectados com *L. infantum* e descreveram as reações crônicas inflamatórias intestinais compostas principalmente por macrófagos. Ao relatar a alta intensidade parasitária encontrada nos tecidos de cães do grupo G1, destaca-se a capacidade de evasão do parasita em relação aos mecanismos de defesa dos hospedeiros vertebrados, que com o tempo, podem tornar-se imunodeficientes, conforme já relatado por Laurenti (2010). As leishmanias são parasitas intracelulares e, em condições de imunodeficiência, elas se multiplicam e migram do tecido linfóide para outros órgãos, exibindo alterações clínicas e patológicas graves, que podem levar à morte do animal (Reis et al., 2010).

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória, desencadeada pelas células T com resposta do tipo 1 (Th1) e está associada a indução da síntese de óxido nítrico pelos macrófagos, ativando assim as funções microbidas dessa célula (REINER et al., 1995). Sendo assim, o IFN- γ controla o crescimento de *Leishmania* spp. em macrófagos (MURRAY et al., 1992) e, na ausência dessa citocina (IFN- γ), Boggiatto et al. (2010) observaram o aumento da IL-10, uma citocina desencadeada pelas células T com resposta do tipo 2 (Th2), no sangue de cães sintomáticos para LVC e concomitante a progressão da doença nesses animais. Na presente pesquisa, não foi estudado o papel das citocinas secretadas por Th1 ou Th2 no controle da leishmaniose intestinal. No entanto, pelos resultados obtidos aqui, verificou-se maior ativação das células CD8⁺ em relação às CD4⁺, levando à suposição de que outros componentes anti-inflamatórios estivessem em ação, e um deles seria oriundo de células regulatórias como os linfócitos Tregs. Isto explicaria a não resolução da

doença, mas sim a sua manutenção e progressão, pois os macrófagos encontrados nos animais do G1 não foram ativados para exercerem suas atividades leishmanicidas, mas sim, utilizados como meio para replicação dos parasitas que apresentam determinado tropismo por essas células, conforme relatado por Naderer; McConville, (2008). Desse modo, a incapacidade de células T ativarem macrófagos para destruir a *Leishmania* spp. parece ser o principal defeito nessa doença, o que se associa com a multiplicação e disseminação do parasita, acometendo múltiplos órgãos (YURDAKUL, 2005).

5 CONCLUSÕES

1) Ocorreu aumento significativo de linfócitos T CD8⁺ e macrófagos no grupo G1 em relação aos grupos G2 e G3, principalmente nos órgãos mais infectados por amastigotas de *L. infantum*, como o duodeno e o cólon. No entanto, o mesmo não ocorreu para os linfócitos T CD4⁺, pois não houve diferença significativa entre os três grupos pesquisados.

2) A intensidade parasitária por *L. infantum* no intestino grosso esteve correlacionada negativamente com as células T CD4⁺, e positivamente com os linfócitos T CD8⁺ e macrófagos, sugerindo que a não ativação de linfócitos T CD4⁺ nos tecidos do intestino favoreceu o desenvolvimento da doença.

3) A presença de células T CD8⁺ e macrófagos no intestino grosso dos cães do G1 associado ao alto parasitismo nesse órgão sugere uma imunorregulação por parte do parasita.

4) No grupo G2, o aumento de linfócitos T CD8⁺ e macrófagos sugere a presença de uma possível infecção oportunista por outro microrganismo, uma vez que esses animais também eram sintomáticos para LVC, embora sem amastigotas intestinais.

6 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2005.

AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; MCMAHON-PRATT, D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 71, p. 401-410, 2003.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, p. 1-88, 2004.

ANDERSON, D. C.; BUCKNER, R. G.; GLENN, B. L.; MACVEAN, D. W. Endemic canine leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 17, n. 1, p. 94-96, 1980.

BADOVINAC, V. P.; HARING, J. S.; HARTY, J. T. Initial T cell receptor transgenic cell precursors frequency dictates critical aspects of the CD8⁺ T cell response to infection. **Immunity**, Cambridge, v. 26, p. 827-841, 2007.

BOGGIATTO, P. M.; RAMER-TAIT, A. E.; METZ, K.; KRAMER, E. E.; GIBSON-CORLEY, K.; MULLIN, K.; HOSTETTER, J. M.; GALLUP, J. M.; JONES, D. E.; PETERSEN, A. C. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, DC, v. 17, n. 2, p. 267-273, 2010.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 59, p. 21-30, 1997.

BLANK, C.; FUCHS, H.; RAPPERSBERGER, K.; RÖLLINGHOFF, M.; MOLL, H. Parasitism of epidermal Langerhans Cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. **The Journal of Infectious Diseases**, Cary, v. 167, p. 418-425, 1993.

CARVALHO, R. P. **Caracterização fenotípica de linfócitos T reativos à *Leishmania* na resposta imune duradoura em pacientes curados de leishmaniose cutânea**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Rio de Janeiro, 2010.

CARVALHO, A. K. **Correlação do perfil das células dendríticas com a resposta imune celular T CD4⁺ e T CD8⁺ na infecção experimental do camundongo BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonenses* e *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2012. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Programa de Fisiopatologia Experimental, São Paulo, 2012.

CHIAPELLA, A. Diagnosis and management of chronic colitis in the dogs and cat. In: KIRK, R. (Ed.). **Current veterinary therapy**. 9. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p. 896-993.

DE LUCA, P. M.; MAYRINK, W.; ALVES, C. R.; COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P.; BERTHO, A. L. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Vaccine**, London, v. 17, p. 1179-1185, 1999.

DOBZANSKI, M. J.; REOME, J. B.; HOLLENBAUGH, J. A.; DUTTON, R. W. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 172, p. 1380-1390, 2004.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; REGO-JUNIOR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado Mato Grosso do sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.

GONZÁLES, J. L.; FERMIN, M. L.; GARCIA, P.; ROLLAN, E.; CASTAÑO, M. Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis. Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. **Journal of Veterinary Medicine**, New York, v. 37, n. 5, p. 377-382, 1990.

GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic background. **International Journal for Parasitology**, London, v. 34, n. 4, p. 433-444, 2004.

HERATH, S.; KROPP, P.; MÜLLER, I. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. **Parasite Immunology**, Chichester, v. 25, n. 11-12, p. 559-567, 2003.

HERVÁS, J.; MENDEZ, A.; CARRASCO, L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C. Pathological study of visceral leishmaniasis in a Jackal. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 293-295, 1996.

JOSHI, T.; RODRIGUEZ, S.; PEROVIC, V.; COCKBURN, I. A.; STAGER, S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8⁺ T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 5, e1000431, 2009.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H. K.; JOHNSON, A. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 21, p. 74-79, 1984.

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses**. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LIEW, F. Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M. J. Macrophage Killing of *Leishmania* parasites in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 144, p. 4794-4797, 1990.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MOSS, D.; PARKINSON, C.; ROGERS, M. V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania* major infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 21, p. 3009-3014, 1991.

MACKAY, C. R. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nature Immunology**, New York, v. 2, p. 95-101, 2001.

MÜLLER, I.; PEDRAZZINI, T.; KROPP, P.; LOUIS, J.; MILON, G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. **Institute Immunology**, Basel, v. 3, n. 6, p. 587-597, 1991.

MURRAY, H. W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and Killing by normal macrophages. **Journal Experimental Medicine**, New York, v. 153, p. 1302-1315, 1981.

MURRAY, H. W.; SQUIRES, K. E.; MIRALLES, C. D.; STOECKLE, M. Y.; GRANGER, A. M.; GRANELLI-PIPERNO, A.; BOGDAN, C. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. **Journal Immunology**, Weinheim, v. 148, n. 6, p. 1858-1863, 1992.

NADERER T.; McCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, Chichester, v. 10, n. 2, p. 301-308, 2008.

NIETO C. G.; GARCÍA-ALONSO, M.; REQUENA, J. M.; MIRÓN, C.; SOTO M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 117-130, 1999.

PEARSON, R. D.; MARCUS, J. L.; SYMES, P. H.; ROMITO, R.; DONOVITZ, G. R. Failure of the phagocytic oxidative responses to protect human monocyte-derived macrophages from infection by *Leishmania donovani*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 129, p. 1282-1286, 1982.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs

experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINTO, A. J. W.; FIGUEIREDO, M. M.; SILVA, F. L.; MARTINS, T.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Vanloese, v. 53, n. 63, p.1-8, 2011.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 13, p. 151-177, 1995.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 341-349, 2010.

RITTING, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, Oxford, v. 16, p. 292-297, 2000.

RODRIGUES, C. A. T.; BATISTA, L. F. S.; TEIXEIRA, M. C. A.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, P. O. M.; OLIVEIRA, G. G. S.; FREITAS, L. A. R.; VERAS, P. S. T. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 143, p. 197-205, 2007.

RUITENBERG, E. J.; SOLANO-GALLEGU, L.; MONEN, J.; PINELLI, E.; RUTTEN, V. P. M. G. Immune responses in canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, Greece, 2001. **Sumaries of Presentation...** Greece: [s.n.], 2001. p. 32-36.

SIMECKA, J. W. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 34, p. 235-259, 1998.

STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8+ T cells in *Leishmania* infections: friends or foes?. Artigo de revisão. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, p. 1-8, 2012.

STENGER, S.; THURING, H.; RÖLLINGOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 180, p. 783-789, p. 1994.

STERN, J. J.; OCA, M. J.; RUBIN, B. Y.; ANDERSON, S. L.; MURRAY, H. W. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 140, p. 3971-3977, 1988.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; 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.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8+ T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Chichester, v. 25, p. 569-579, 2003.

WAKELIN, D. **Immunity to parasites**: how parasitic infections are controlled. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 204 p.

WHEEHER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, Chichester, v. 79, p. 662-674, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva, 2010.

YURDAKUL, P. Immunopathogenesis of *Leishmania* infections. **Mikrobiyoloji Bulteni**, Ankara, v. 39, p. 363-381, 2005.

Tabela 10. Resultado em escore e intensidade parasitária (+) da análise semiquantitativa da intensidade parasitária em tecidos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) avaliados na região da mucosa (unidade de vilo e cripta - UVC) de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, com escore parasitário variando de 1 (+) a 4 (++++). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Escore e intensidade parasitária (+) de amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> em tecidos intestinais de cães com leishmaniose visceral canina da mucosa (UVC)					
Grupo	Número do Cão	Duodeno	Jejuno	Íleo	Cólon
Grupo 01 (G1)	01	N	N	N	3 (+++)
	02	2 (++)	N	2 (++)	N
	03	N	N	N	3 (+++)
	04	4 (++++)	3 (+++)	4 (++++)	3 (+++)
	05	3 (+++)	2 (++)	3 (+++)	4 (++++)
Média (escore)		1,8 ^a	1 ^a	1,8 ^a	2,6 ^a

Nota: N-amostal=5. Intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). De acordo com o teste F não existe diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade. Análises geradas pelo programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2015).

Tabela 11. Resultado da análise semiquantitativa dos linfócitos T CD4⁺ em tecidos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) avaliados na região da mucosa (unidade de vilos e cripta - UVC) de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, com escore parasitário variando de 1 (+) a 4 (++++). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Escore e intensidade (+) de linfócitos T CD4 ⁺ no intestino de cães com e sem amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>					
Grupos	Cães	Duodeno	Jejuno	Íleo	Cólon
Grupo 01 (G1)	01	1 (+)	1 (+)	1 (+)	2 (++)
	02	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
	03	3 (+++)	2 (++)	2 (++)	1 (+)
	04	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
	05	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
Grupo 02 (G2)	01	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
	02	1 (+)	2 (++)	1 (+)	2 (++)
	03	1 (+)	1 (+)	1 (+)	2 (++)
	04	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
	05	1 (+)	2 (++)	1 (+)	1 (+)
Grupo 03 (G3)	01	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
	02	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
	03	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
Média do escore obtido entre os grupos					
Grupos	Animais	Duodeno	Jejuno	Íleo	Cólon
G1	N=5	1,4 ^a	1,2 ^a	1,2 ^a	1,2 ^a
G2	N=5	1 ^a	1,4 ^a	1 ^a	1,4 ^a
G3	N=3	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a

Nota: Comparação de médias pelo teste de Duncan. Intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Entre colunas e linhas, proporções com letra idêntica (a) não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Análises geradas pelo programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2015).

Tabela 12. Resultado da análise semiquantitativa dos linfócitos T CD8⁺ em tecidos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) avaliados na região da mucosa (unidade de vilos e cripta - UVC) de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, com escore parasitário variando de 1 (+) a 4 (++++). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Escore e intensidade (+) de linfócitos T CD8⁺ no intestino de cães com e sem amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>					
Grupos	Cães	Duodeno	Jejuno	Íleo	Cólon
Grupo 01 (G1)	01	1 (+)	1 (+)	3 (+++)	4 (++++)
	02	2 (++)	2 (++)	2 (++)	3 (+++)
	03	4 (++++)	3 (+++)	2 (++)	4 (++++)
	04	3 (+++)	3 (+++)	3 (+++)	3 (+++)
	05	4 (++++)	2 (++)	2 (++)	4 (++++)
Grupo 02 (G2)	01	4 (++++)	4 (++++)	3 (+++)	2 (++)
	02	2 (++)	1 (+)	1 (+)	2 (++)
	03	3 (+++)	2 (++)	3 (+++)	3 (+++)
	04	2 (++)	2 (++)	1 (+)	2 (++)
	05	2 (++)	2 (++)	2 (++)	3 (+++)
Grupo 03 (G3)	01	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
	02	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
	03	1 (+)	1 (+)	1 (+)	1 (+)
Média do escore obtido entre os grupos					
Grupos	Animais	Duodeno	Jejuno	Íleo	Cólon
G1	N=5	2,8 ^a	2,2 ^b	2,4 ^b	3,6 ^a
G2	N=5	2,6 ^b	2,2 ^b	2 ^b	2,4 ^b
G3	N=3	1 ^c	1 ^c	1 ^c	1 ^c

Nota: Comparação de médias pelo teste de Duncan. Intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Entre colunas e linhas, proporções com letra idêntica (a/b/c) não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Análises geradas pelo programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2015).

Tabela 13. Resultado da análise semiquantitativa dos macrófagos em tecidos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e cólon) avaliados na região da mucosa (unidade de vilo e cripta - UVC) de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, com escore parasitário variando de 1 (+) a 4 (++++). Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Escore e intensidade (+) de macrófagos no intestino de cães com e sem amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>					
Grupos	Cães	Duodeno	Jejuno	Íleo	Cólon
Grupo 01 (G1)	01	3 (+++)	2 (++)	2 (++)	3 (+++)
	02	2 (++)	2 (++)	4 (++++)	4 (++++)
	03	3 (+++)	3 (+++)	2 (++)	4 (++++)
	04	4 (++++)	3 (+++)	4 (++++)	4 (++++)
	05	4 (++++)	3 (+++)	3 (+++)	4 (++++)
Grupo 02 (G2)	01	4 (++++)	3 (+++)	2 (++)	3 (+++)
	02	3 (+++)	2 (++)	2 (++)	2 (++)
	03	2 (++)	3 (+++)	3 (+++)	2 (++)
	04	3 (+++)	2 (++)	3 (+++)	2 (++)
	05	3 (+++)	2 (++)	3 (+++)	2 (++)
Grupo 03 (G3)	01	2 (++)	2 (++)	2 (++)	2 (++)
	02	2 (++)	2 (++)	2 (++)	2 (++)
	03	2 (++)	2 (++)	2 (++)	2 (++)
Média do escore obtido entre os grupos					
Grupos	Animais	Duodeno	Jejuno	Íleo	Cólon
G1	N=5	3,2 ^a	2,6 ^{bcd}	3 ^{bc}	3,8 ^a
G2	N=5	3 ^{bc}	2,4 ^{cd}	2,6 ^{bcd}	2,2 ^d
G3	N=3	2 ^d	2 ^d	2 ^d	2 ^d

Nota: Comparação de médias pelo teste de Duncan. Intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Entre colunas e linhas, proporções com letra idêntica (a/b/c/d) não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Análises geradas pelo programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2015).

Tabela 14. Análise de correlação entre as células monocíticas (linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos) com a intensidade parasitária de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino de cães naturalmente infectados do grupo G1 e, somente entre as células monocíticas para os cães do grupo G2. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

Análise de Correlação Linear de Spearman para células monocíticas semiquantificadas no intestino de cães com LVC			
Grupo	Variáveis	Intestino Delgado	Intestino Grosso
G1 (N = 5)	SIP x SCD4 ⁺	-0,54	-0,89*
	SIP x SCD8 ⁺	-0,76	0,91*
	SIP x SMAC	-0,55	0,88*
	SCD4 ⁺ x SCD8 ⁺	0,54	-0,89*
	SCD4 ⁺ x SMAC	-0,18	-0,92*
	SCD8 ⁺ x SMAC	0,71	0,97*
G2 (N=5)	SCD4 ⁺ x SCD8 ⁺	0,59	0,17
	SCD4 ⁺ x SMAC	-0,65	NA
	SCD8 ⁺ x SMAC	0,89*	NA

Nota: SIP = escore da intensidade parasitária; SCD4⁺ = escore da presença de linfócitos T CD4⁺; SCD8⁺ = escore da presença de linfócitos T CD8⁺; SMAC = escore da presença de macrófagos; NA = análise não avaliada. (*) teste significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Análises realizadas de acordo com o coeficiente de correlação linear de Spearman ($p \leq 0,05$). Análises geradas pelo programa R, versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2015).

Figura 12. Fotos de secções histológicas do intestino delgado (A, B, C e D) e do intestino grosso (E e F) de cães com LVC e com amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino, pertencentes ao grupo experimental G1. Fotos A, C e E: imunomarcadas para linfócitos T CD4⁺. Fotos B, D e F: imunomarcadas para linfócitos T CD8⁺. A e B: vilo da região do duodeno (animal 04). C e D: cripta basal do duodeno (animal 04). E e F: cripta basal do cólon (animal 05). Coloração = Imunoistoquímica. Objetiva = 40x. Barras = 50µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

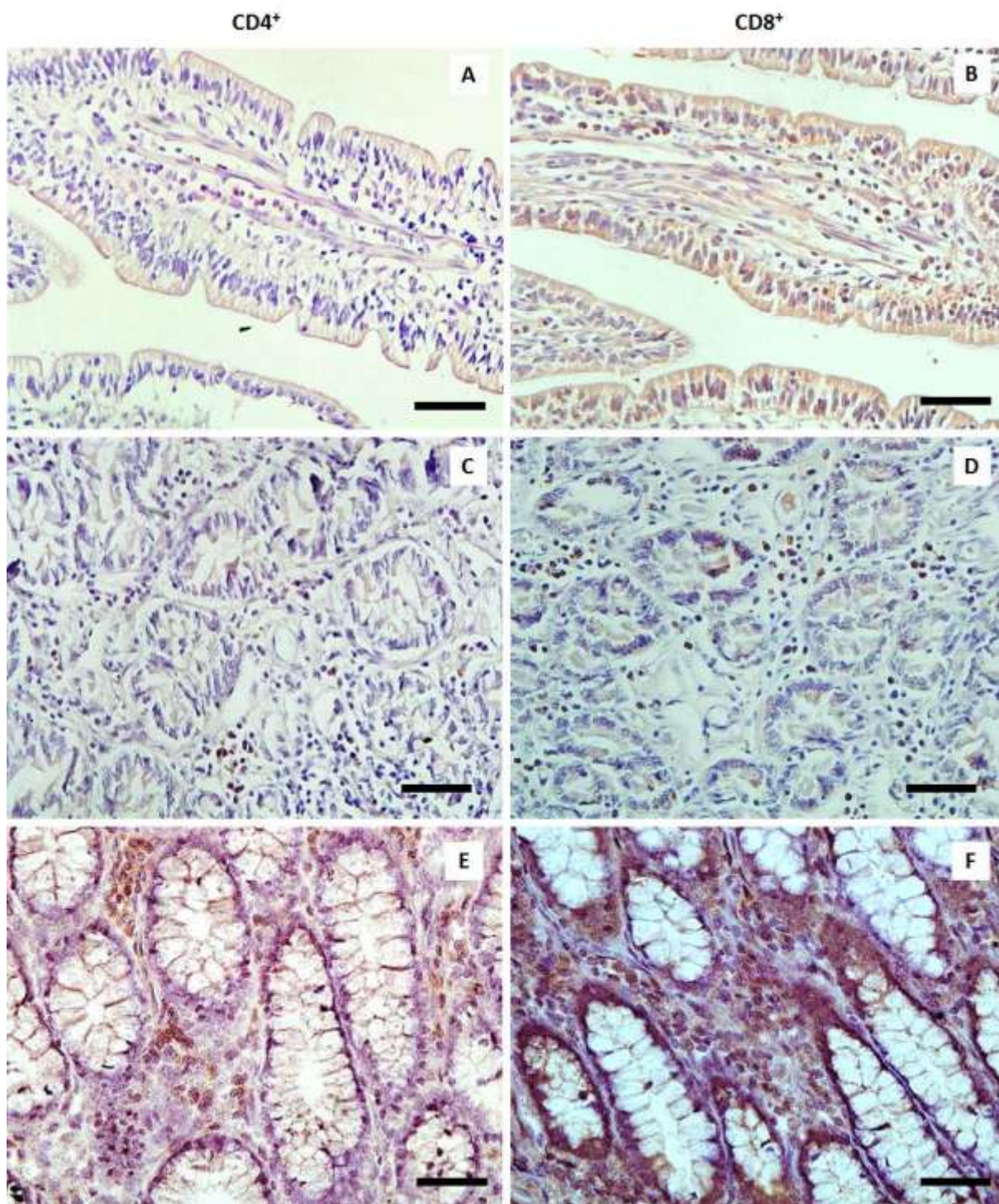


Figura 13. Fotos de secções histológicas do intestino delgado (A, B, C e D) e do intestino grosso (E e F) de cães com LVC e sem amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino, pertencentes ao grupo experimental G2. Fotos A, C e E: imunomarcadas para linfócitos T CD4⁺. Fotos B, D e F: imunomarcadas para linfócitos T CD8⁺. A e B: vilo da região do duodeno (animal 01), objetiva 40x. C e D: cripta basal e placa de Peyer do íleo (animal 03), objetiva 20x. E e F: vilosidades do cólon (animal 05), objetiva 40x. Coloração = Imunoistoquímica-peroxidase. Barras = 50µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

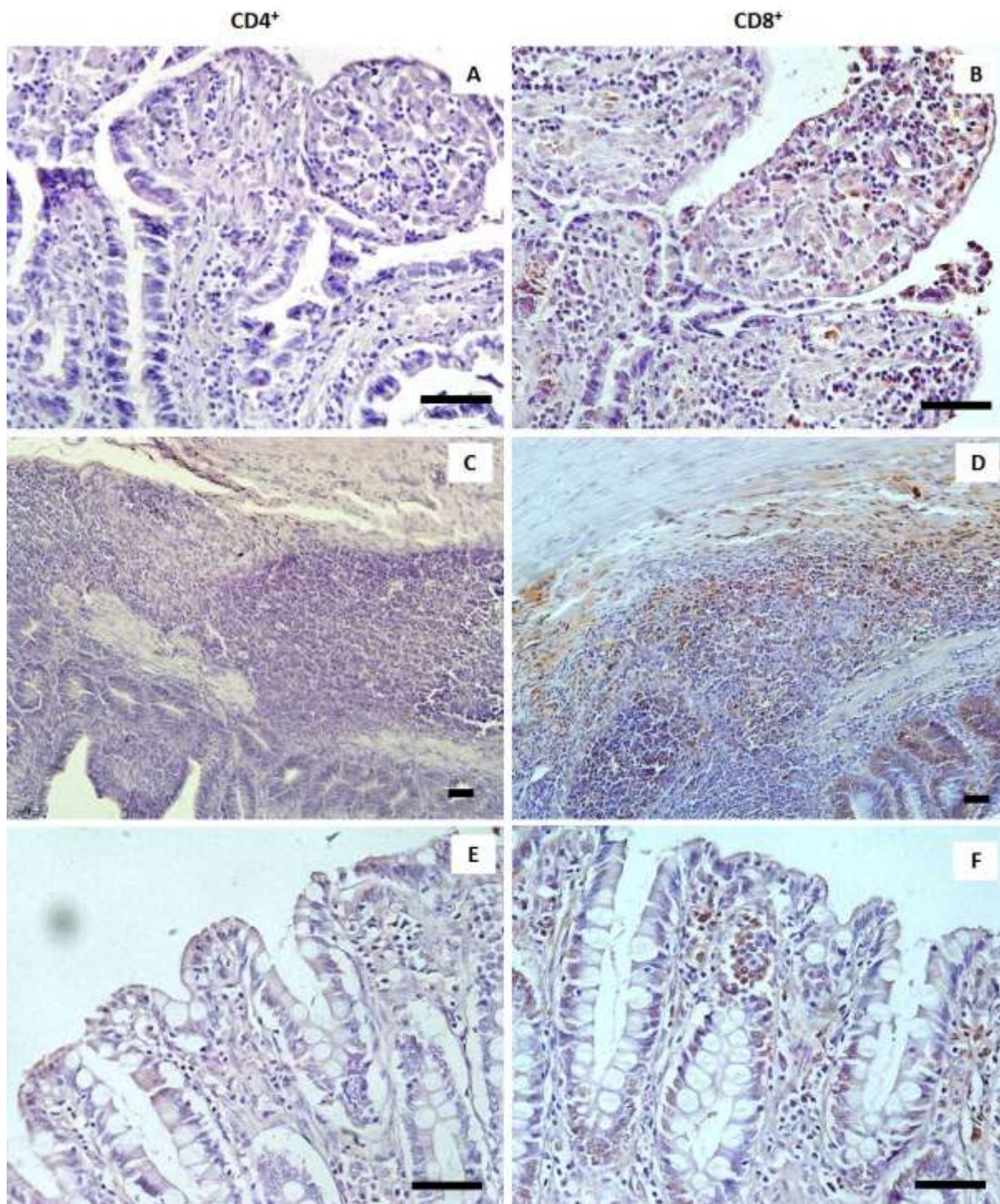


Figura 14. Fotos de secções histológicas do intestino delgado (A, B) e do intestino grosso (C e D) de cães com LVC e com amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino, pertencentes ao grupo experimental G1. A: base da cripta e submucosa do íleo com aglomerado de células inflamatórias imunomarcada para linfócitos T CD4⁺ (animal 05). B: mesma região da foto A, porém imunomarcada para linfócitos T CD8⁺. C: placa de *Paeyer* presente no cólon imunomarcada para linfócitos T CD4⁺ (animal 04). D: mesma região da foto C, porém imunomarcada para linfócitos T CD8⁺. Coloração = Imunoistoquímica-peroxidase. Objetiva = 40x. Barras = 50µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

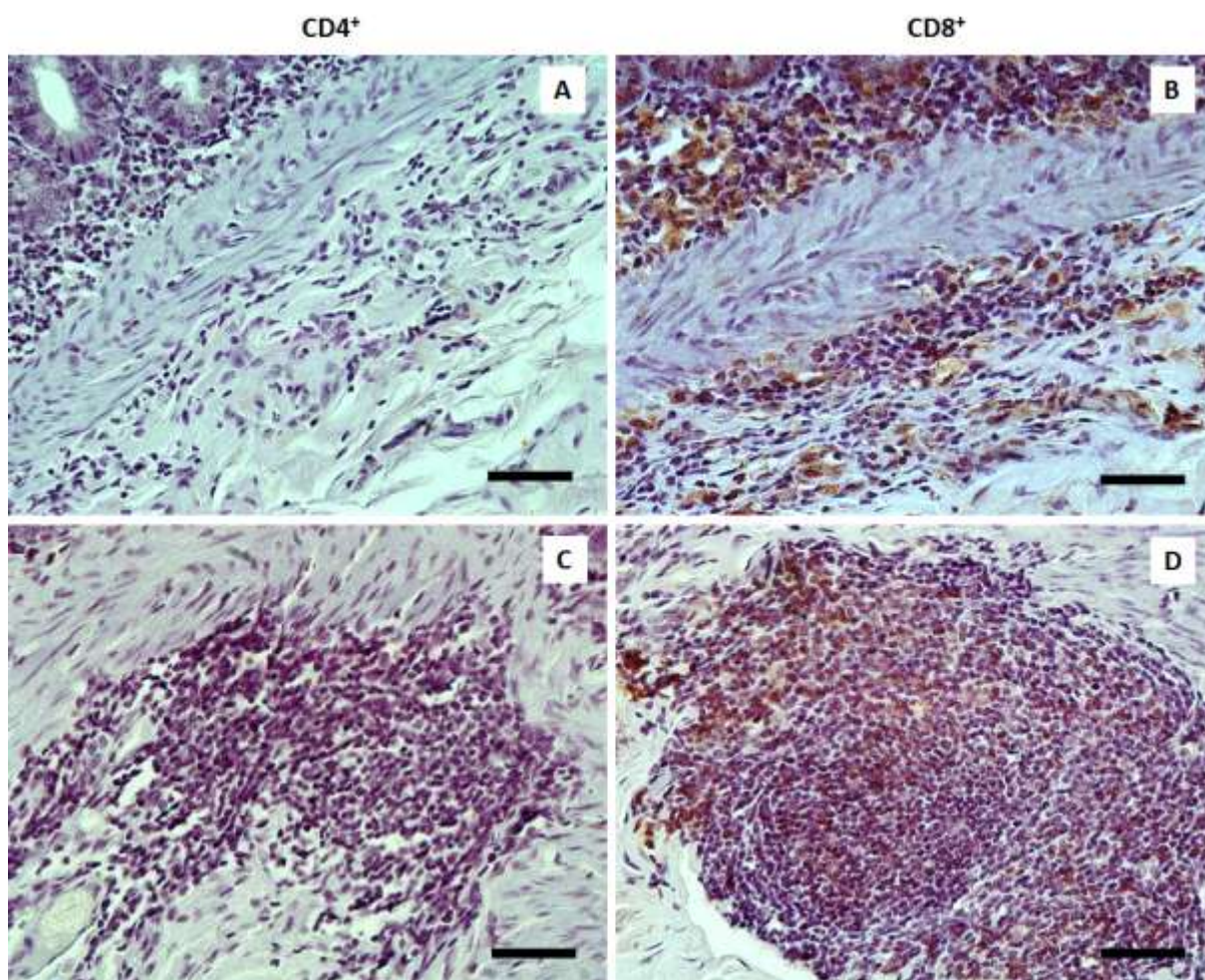


Figura 15. Escore médio obtido do estudo semiquantitativo de linfócitos T ($CD4^+$) na mucosa intestinal (UVC) do duodeno, jejuno, íleo e cólon de cães com leishmaniose visceral canina (LVC) e com a presença de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino (G1), na ausência do parasita (G2) e, cães controle sem a doença (G3). A análise estatística na comparação de médias foi realizada de acordo com o teste de Duncan. Proporções com letras idênticas (a) não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

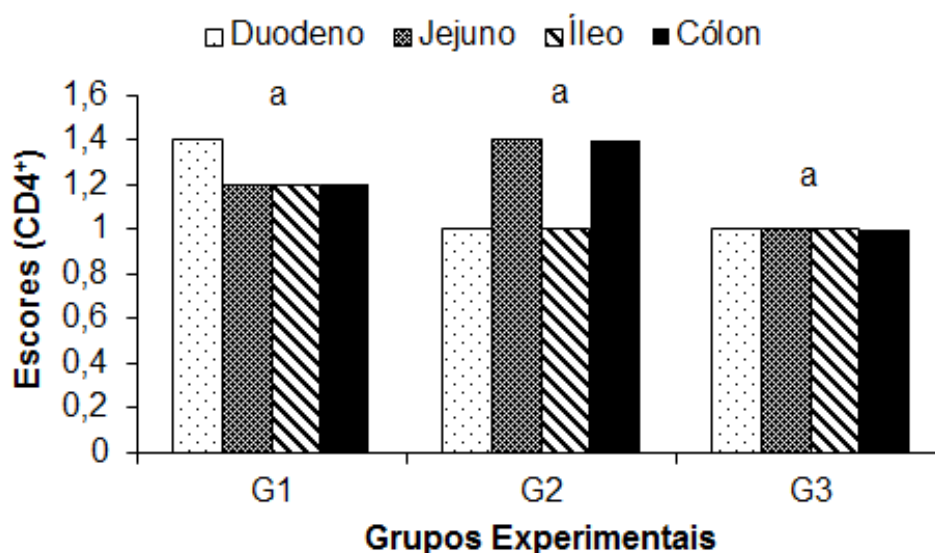


Figura 16. Escore médio obtido do estudo semiquantitativo de linfócitos T (CD8⁺) na mucosa intestinal (UVC) do duodeno, jejuno, íleo e cólon de cães com leishmaniose visceral canina (LVC) e com a presença de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino (G1), na ausência do parasita (G2) e, cães controle sem a doença (G3). A análise estatística na comparação de médias foi realizada de acordo com o teste de Duncan. Proporções com letras idênticas (a) não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

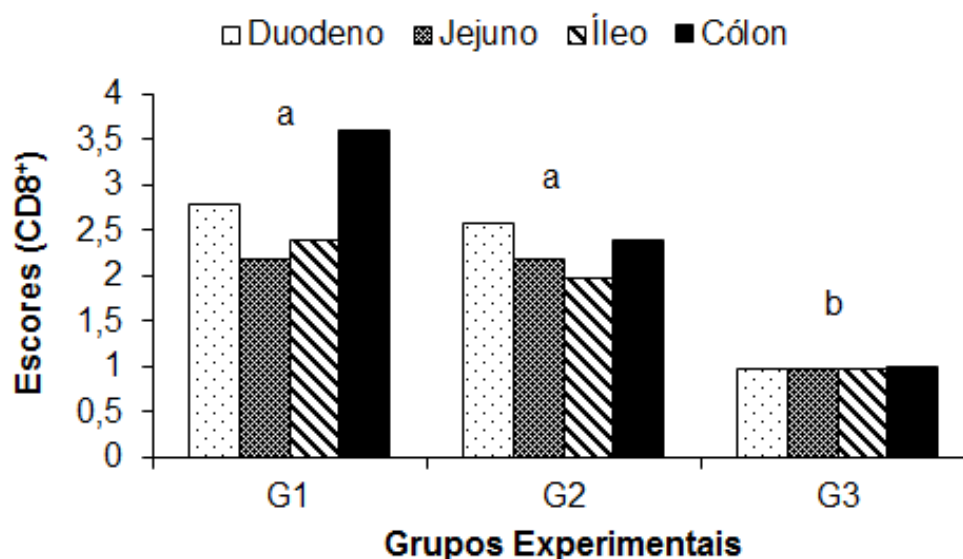


Figura 17. Escore médio obtido do estudo semiquantitativo de macrófagos (MAC) na mucosa intestinal do duodeno, jejuno, íleo e cólon de cães com leishmaniose visceral canina (LVC) e com a presença de amastigotas de *L. infantum* no intestino (G1), na ausência do parasita (G2) e, cães sem a doença (G3). A comparação de médias foi realizada de acordo com o teste de Duncan. Proporções com letras diferentes (a/b/c) são estatisticamente significantes a nível de 5% de probabilidade. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

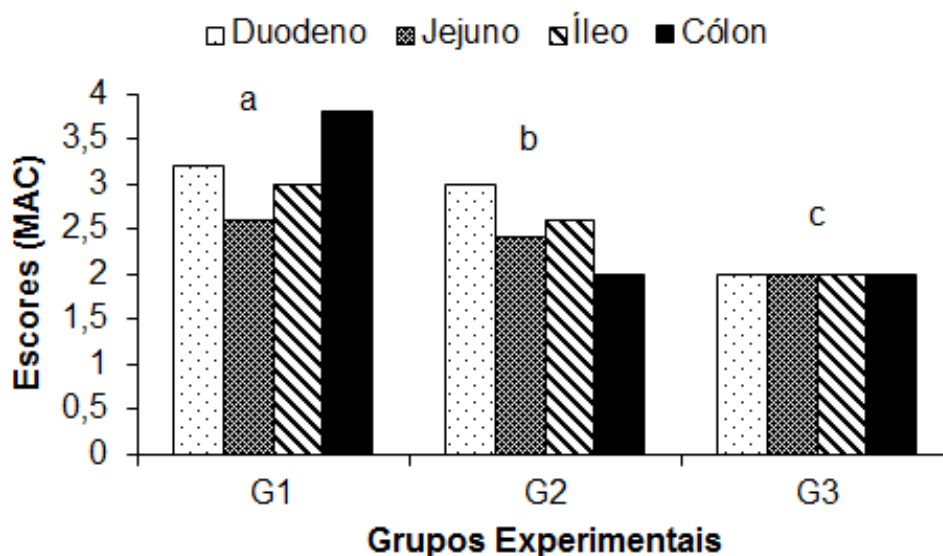


Figura 18. Fotos de secções histológicas do intestino grosso de cães com LVC em presença e/ou ausência de amastigotas de *Leishmania infantum* no intestino, pertencentes aos grupos experimentais G1 e G2. Fotos A, C e E: microscopia do cólon de animais pertencentes ao grupo G2. Fotos B, D e F: microscopia do cólon de animais pertencentes ao grupo G1. A e B: entre as criptas do cólon. C e D: cripta basal e submucosa. E e F: submucosa. Setas vermelhas = macrófagos normais. Setas amarelas = macrófagos hipertróficos com amastigotas. Coloração = histoquímica por H&E. Objetiva = 100x. Barras = 50µm. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2015.

