

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTA IMUNE DIFERENCIADA NO FÍGADO E NO
BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Pamela Rodrigues Reina Moreira

Médica Veterinária

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTA IMUNE DIFERENCIADA NO FÍGADO E NO
BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Pamela Rodrigues Reina Moreira

Orientador: Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária (Patologia Animal)

2013

M838r Moreira, Pamela Rodrigues Reina
**Resposta imune diferenciada no fígado e no baço de cães
com leishmaniose visceral**

/ Pamela Rodrigues Reina Moreira. – – Jaboticabal, 2013
xii, 66 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Banca examinadora: Antônio Carlos Alessi, Rosângela Zacarias
Machado, Wagner Luiz Tafuri, Karen Regina Lemos

Bibliografia

1. Apoptose. 2. Cão. 3. *Leishmania chagasi*. 4. Resposta imune
compartimentalizada. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993:663.7

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RESPOSTA IMUNE DIFERENCIADA NO FÍGADO E NO BAÇO DE CÃES
COM LEISHMANIOSE VISCERAL

AUTORA: PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA
VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal

Profa. Dra. ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal

Prof. Dr. WAGNER LUIZ TAFURI

Universidade Federal de Minas Gerais / Belo Horizonte/MG

Prof. Dr. KAREN REGINA LEMOS

Universidade Estadual do Centro Oeste / Guarapuava/PR

Data da realização: 08 de março de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA – nascida em 31 de outubro de 1982, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. Médica Veterinária formada em 2004, no Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto - SP. Durante o curso de graduação foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na modalidade de Iniciação Científica, no período de agosto de 2002 a julho de 2003, sob a orientação do Prof. Dr. Wilson Machado de Souza, na área de anatomia de animais domésticos. Posteriormente usufruiu de bolsa de iniciação científica do Centro Universitário Barão de Mauá, no período de fevereiro a dezembro de 2004, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Sérgio Patto dos Santos, na área de cirurgia de grandes animais. No período de fevereiro de 2005 a janeiro de 2007 cursou Residência Médica na área de Patologia Veterinária, na Faculdade de Marília (UNIMAR), sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Hataka. Recebeu o título de mestre em Medicina Veterinária, na área de Patologia Animal em fevereiro de 2010 (FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal) sob a orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Em março deste mesmo ano ingressou no doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (área de concentração em Patologia Animal), na mesma instituição, sob a orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos.

Dedico este trabalho a minha filha Gabriella e meu sobrinho Patricky, pelo amor, carinho, por estarem sempre ao meu lado e me proporcionarem muita alegria.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus e a Nossa Senhora por estarem sempre me protegendo e me guiando em todos os momentos da minha vida e dando-me força. E sei também que será essa mesma força que me fará seguir sempre em frente.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, por acompanhar cada etapa deste trabalho, pela dedicação, incentivo, valiosos ensinamentos e, principalmente, pelas demonstrações de carinho e amizade em todos os momentos. Novamente meus agradecimentos e outras tantas vezes que tenho certeza, não serão suficientes para agradecê-la por tudo que passamos juntas nestes cinco anos. Aprendi muito com o seu exemplo de ser e agir. Tenho orgulho de dizer que sou sua orientada. Sinceramente, a você, minha eterna gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi, pela amizade, incentivo, confiança, ensinamentos, pelas sugestões na qualificação e defesa e por mais uma vez aceitar fazer parte da minha banca. Minha eterna admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Eduardo Juan Gimeno, pelo carinho, amizade, por ter ensinado de forma tão desprendida o fruto de seus longos anos de estudo, pesquisa e prática na técnica de imuno-histoquímica e pelas grandes contribuições na qualificação. Manifesto minha admiração, respeito e meu eterno agradecimento.

Ao Professor Gervásio Henrique Bechara, pelas correções na qualificação, pela amizade e carinho que tem com os pós-graduandos.

Ao Professor Estevam Guilherme Lux Hoppe, pelas grandes contribuições feitas na qualificação.

À Professora Rosangela Zacarias Machado, pelos ensinamentos durante a pós-graduação e pelas ótimas sugestões.

Ao Professor Wagner Luiz Tafuri, obrigado por aceitar meu convite e pelas contribuições nas correções, foi uma honra tê-lo em minha banca,.

À Professora Karen Regina Lemos, obrigada por aceitar nosso convite e pelas sugestões feitas a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Danísio Prado Munari, que desempenhou papel especial neste trabalho, e em muitos que ainda estão por vir. Agradeço por sua ajuda na análise estatística e também por sua amizade e companheirismo.

À Francisca de Assis Ardisson (FCAV/UNESP), do laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária, pelo processamento do material, possibilitando que eu realizasse meu experimento.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (SP) por cederem os animais deste estudo.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2009/15736-7).

A todos meus colegas de pós-graduação, em especial aos amigos Márcio de Barros Bandarra, Gabriela Noronha de Toledo, Mônica Costa Oliveira, Wilson Gómez Manrique, Mayara Caroline Rosolem e Andresa Matsui, pela grande amizade e companhia sempre presentes em todos os momentos.

Aos meus pais Acácio e Tânia pela dedicação e amor. A vocês por tudo o que sou hoje.

À minha irmã Paloma pelo amor e amizade. A você pela confiança depositada em mim, pelo apoio e torcida por mais essa vitória.

À minha filha Gabriella e meu sobrinho Patricky, pelos momentos de alegria que só vocês souberam muito bem me proporcionar, pelo amor e compreensão nos momentos em que não pude estar junto a vocês.

À minha avó Janice, pelo carinho, amor, incentivo e por sempre estar rezando por mim.

Obrigada a todos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral.....	03
2.2 Sinais clínicos e alterações histopatológicas.....	06
2.3 Resposta imune do cão.....	07
III. OBJETIVOS.....	12
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Material.....	13
4.2 Análise Histopatológica.....	14
4.3 Análise Imuno-Histoquímica.....	14
4.4 Análise Estatística.....	16
V. RESULTADOS.....	18
5.1 Análise Anatomopatológica.....	18
5.2 Análise Histopatológica.....	18
5.3 Análise Imuno-histoquímica e estatística.....	22
VI. DISCUSSÃO.....	41
VII. CONCLUSÕES.....	56
VIII. REFERÊNCIAS.....	57



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 028220/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Participação das células Natural Killer hepáticas (PIT) no fígado de cães com leishmaniose visceral**", sob a responsabilidade da Profª Drª Rosemeri de Oliveira Vasconcelos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2012.

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

RESPOSTA IMUNE DIFERENCIADA NO FÍGADO E NO BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - Na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) a resposta imune órgão-específica pode variar de acordo com o órgão afetado, favorecendo ou não a multiplicação do parasito *Leishmania (L.) chagasi*. O objetivo deste estudo foi analisar, por meio, da técnica de imuno-histoquímica, o fígado e o baço de cães com Leishmaniose Visceral (LV), considerando a carga parasitária, a densidade de células Natural Killer (NK), de macrófagos e de linfócitos, bem como, células em apoptose, de células expressando moléculas de MHC-II e as citocinas TGF- β e TNF- α . Estes resultados foram comparados com os diferentes estágios da doença. Utilizou-se 71 cães naturalmente infectados de área endêmica para LV, classificados nos grupos sintomático (S), assintomático (A) e oligossintomático (O). Um grupo controle foi composto por 10 cães de área não endêmica para LVC. As células positivas para os anticorpos CD56, caspase 3 clivada, MHC-II, TGF- β , TNF- α , MAC387, CD3 e para a carga parasitária (soro hiperimune de cão positivo para LVC) foram submetidas a testes não paramétricos para a comparação entre os grupos. O baço foi o órgão que apresentou a maior carga parasitária. A apoptose de linfócitos foi maior nos cães sintomáticos quando comparados ao grupo controle. A intensidade de inflamação foi elevada nos cães com doença avançada (grupo S), caracterizada pela formação de granulomas difusos contendo parasitos. O fígado mostrou menor carga parasitária, um perfil celular dos granulomas rico em linfócitos. A densidade de células NK foi baixa no fígado e baço, bem como a imunodeteção das citocinas TGF- β e TNF- α . A expressão de MHC-II foi maior no baço de cães do grupo S. Portanto, pode-se sugerir que existe um padrão de resposta diferenciado no baço e fígado, porém outra metodologia deveria ser utilizada para quantificar de forma mais precisa as citocinas TGF- β e TNF- α nestes órgãos.

Palavras-Chave: Apoptose, cão, *Leishmania chagasi*, resposta imune compartimentalizada.

DIFFERENTIATED IMMUNE RESPONSE IN LIVER AND SPLEEN OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT – In Canine Visceral Leishmaniasis (LVC), the immune response to organ-specific can vary with the affected organ, thus favoring or hindering the multiplication of the parasite *Leishmania (L.) chagasi*. The aim of this study was to analyze by immunohistochemistry, the liver and spleen of dogs with visceral leishmaniasis (VL), considering the parasitic load, the density of Natural Killer cells (NK), macrophages and lymphocytes, as well apoptosis cells, cells expressing molecules of MHC-II and the cytokines TGF- β and TNF- α . These results were compared with different stages of disease. We used 71 naturally infected dogs from an endemic area for VL, classifieds in the symptomatic (S), asymptomatic (A) and oligosymptomatic (O) groups. A control group consisted of 10 dogs from non-endemic area for LVC. The positive cells for CD56 antibody, cleaved caspase 3, MHC-II, TGF- β , TNF- α , MAC387, CD3 and parasite load (serum hyperimmune dog seropositive for VL) were subjected to nonparametric tests for comparison between groups. The spleen was the organ with the highest parasite load. The apoptosis of lymphocytes was higher in symptomatic dogs when compared to the control group. The intensity of inflammation was higher in dogs with advanced disease (group S), characterized by the formation of granulomas containing diffuse parasites. The liver showed lowest parasite load, a profile of cell granulomas rich in lymphocytes. The density of NK cells was low in the liver and spleen and few cells were positive for cytokines TGF- β and TNF- α . Expression of MHC-II was higher in the spleen of dogs in Group S. Therefore, one may suggest that there is a differential pattern of response in the spleen and liver, but other methods should be used to quantify more accurately the cytokines TGF- β and TNF- α in these organs.

Keywords: Apoptosis, dog, *Leishmania chagasi*, compartmentalized immune response.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Assintomático

C: Controle

IL: Interleucinas

LV: Leishmaniose visceral

LVC: Leishmaniose visceral canina

MHC II: Complexo de histocompatibilidade principal de classe II

NK: Natural Killer

O: Oligossintomático

S: Sintomático

SFM: Sistema fagocítico mononuclear

TGF- β : Fator de transformação de crescimento β

Th1: Linfócitos T helper 1

Th2: Linfócitos T helper 2

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

I. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose de distribuição mundial, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A forma visceral desta enfermidade também é denominada Calazar ou Febre Dum-Dum, tendo como integrantes do seu ciclo evolutivo os mamíferos domésticos e silvestres (incluindo humanos) e insetos vetores do protozoário. No continente americano o agente etiológico envolvido é *Leishmania (Leishmania) chagasi*, que é considerada idêntica a *Leishmania (Leishmania) infantum* descrita em alguns países da Europa, Ásia e do Mediterrâneo. Esse protozoário é da família *Trypanosomatidae*, sendo considerado um parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear dos hospedeiros vertebrados. Nas Américas, o principal vetor da *Leishmania* é o flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis*.

A leishmaniose visceral canina (LVC) caracteriza-se por um quadro sistêmico crônico, com manifestações clínicas inespecíficas, similares às do homem. A doença é mais prevalente na população canina que na humana, pois casos humanos geralmente são precedidos por casos caninos. Os cães também apresentam uma maior quantidade de parasitos na pele, quando comparado ao homem, o que favorece a infecção dos insetos vetores. Uma das estratégias para o controle da LVC no Brasil, indicada pelo Ministério da Saúde, consiste na eutanásia dos cães positivos para o protozoário, com ou sem sinais clínicos, por estes serem considerados a principal fonte de infecção para o homem.

Leishmania (Leishmania) chagasi tem a capacidade de sobreviver aos mecanismos de defesa do seu hospedeiro vertebrado canino. Sua principal estratégia é modular a resposta imune, causando um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, induzindo em cães susceptíveis e com maior carga parasitária, uma predominância de resposta imune humoral, com perfil de citocinas Th2, ineficientes no controle da multiplicação do protozoário dentro do macrófago.

As células exterminadoras naturais ou células Natural Killer (NK) são linfócitos pertencentes ao sistema de imunidade inata. São ativadas de imediato frente a um patógeno e atuam no combate às infecções virais e células tumorais, pela sua ação

citotóxica, sem a necessidade de reconhecimento prévio de um antígeno específico. Elas não destroem os patógenos diretamente, mas atuam sobre células infectadas ou neoplásicas. Não são células fagocíticas. Destroem as outras células por meio de mecanismos semelhantes aos usados pelos linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos), pela degranulação e liberação de enzimas que ativam os mecanismos de apoptose da célula alvo.

O objetivo deste estudo foi avaliar o fígado e o baço de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* e comparar estes achados com o papel das células NK, com a imunodeteção de TNF- α , TGF- β , de células apoptóticas, de macrófagos, de linfócitos, de MHC II e da carga parasitária nos cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma das mais importantes zoonoses emergentes de origem parasitária, sendo considerada a segunda maior enfermidade no mundo causada por protozoários, perdendo apenas para a malária. Esta doença tem distribuição mundial, sendo causada por protozoários do gênero *Leishmania*. No continente Americano, é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, enquanto que *Leishmania (Leishmania) infantum* é descrita em alguns países da Ásia e do Mediterrâneo (WHO, 2008). Esse parasito pertence à ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae. É um parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado (REY, 2001).

Existem divergências sobre o uso de *L. chagasi* para a designação da espécie do agente etiológico de LVC no continente Americano. Alguns autores consideram que *Leishmania (Leishmania) chagasi* é idêntica a *Leishmania (Leishmania) infantum* e, por isso, o nome *chagasi* seria sinônimo de *infantum*. Outros autores chamam atenção para diferenças bioquímicas que existem entre elas e, usam preferencialmente *L. (L.) chagasi* (MAURÍCIO et al., 1999; BRASIL, 2006; SOARES, 2007). Shaw (2006) propõe o uso da nomenclatura *L. (L.) infantum chagasi*, pois o mesmo acredita que existem diferentes linhagens de *L. infantum* no continente americano, de origem importada ou autóctone, que tornaria inadequado considerá-la sinônimo de *L. chagasi*. Acredita que estas diferenças no parasito foram estimuladas pela seleção natural imposta sobre o inseto vetor, que teria sofrido alterações nas galectinas específicas da parede intestinal do *Lutzomyia* sp., responsáveis pela adesão do protozoário. O autor sugere ainda que seja feito um estudo avaliando este aspecto de adesão entre os flebotomíneos do continente americano e europeu.

Em 1903, Leishman reconheceu a semelhança do parasito com as formas arredondadas observadas nas infecções por *Trypanosoma* sp. Neste mesmo ano,

Donovan descreveu estes mesmos parasitos na enfermidade denominada Febre Dum-Dum ou Calazar (PESSÔA e MARTINS, 1988; REY, 2001).

No Brasil, a transmissão de *L. (L.) chagasi*, se dá pela picada do vetor *Lutzomyia longipalpis*. Recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi também incriminado como vetor da doença no Estado do Mato Grosso do Sul. Estes flebotomíneos são conhecidos popularmente como mosquitos-palha, asa dura, cangalha, birigui ou tatuquira e pertencem à família Psychodidae, sub-família Phlebotominae. Eles medem cerca de 1,0 a 4,0mm de comprimento, possuem o corpo e asas pilosos e castanho-claro e possuem um comportamento característico de voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas, além de apresentarem atividade crepuscular. As formas imaturas desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e com baixa incidência luminosa (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; CAMARGO-NEVES et al., 2001; CASTRO, 1996; MONTEIRO et al., 2005; SOARES e TURCO, 2003).

Leishmania (Leishmania) chagasi pode ser encontrada nas formas promastigota e paramastigota (formas flageladas), no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados. A forma amastigota (formas sem flagelo livre) é observada no citoplasma de fagócitos dos hospedeiros vertebrados (REY, 2001).

Epidemiologicamente, a LVC é considerada mais importante que a doença humana, pois é mais prevalente e apresenta grande número de cães infectados com parasitismo cutâneo. Essas características tornam o cão doméstico o principal reservatório do parasito (REY, 2001). Já nos mamíferos silvestres, *Leishmania* sp. causa pouco ou nenhum efeito patológico, caracterizando-se por uma relação de equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro (FALQUETO e SESSA, 2005).

A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de adquirir leishmaniose, com registro aproximado de dois milhões de novos casos de diferentes formas clínicas. Atualmente, a doença afeta 88 países dos quatro continentes. Aproximadamente 90% de casos da forma visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão e há estimativa de prevalência de 14 milhões de casos e 59 mil óbitos, número que, no caso de doenças parasitárias, só é superado pelas mortes causadas por malária (WHO, 2008; ALVES, 2009).

Nas Américas, a leishmaniose visceral ocorre desde o México até a Argentina, sendo que cerca de 90% dos casos humanos descritos são procedentes do Brasil (GRIMALDI et al., 1989). Ela apresenta comportamento epidemiológico cíclico, com elevação de casos em períodos médios a cada cinco anos (ALVES, 2009).

Muitos estados brasileiros têm sido atingidos por esta zoonose, com elevada taxa de mortalidade de pessoas infectadas (SAVANI et al., 2003; NAVEDA et al., 2006). Já foram identificados casos humanos em 19 dos 27 estados da Federação, com casos autóctones descritos em aproximadamente 1600 municípios. A maioria destes ocorre na região Nordeste do país (MELO, 2004).

O primeiro caso de leishmaniose visceral canina, no Estado de São Paulo, foi diagnosticado em maio de 1998, no município de Araçatuba, na UNESP - FMVA (Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba). Em abril de 1999 foi relatado o primeiro caso humano da doença e a presença do vetor já havia sido identificada desde 1997. Em Araçatuba, cerca de 37.000 cães infectados foram submetidos à eutanásia, no período de 2002 a 2006. A partir de então o número de casos caninos da doença vem aumentando consideravelmente (ZORZETTO, 2008). Segundo a Direção Regional de Saúde, 41 municípios já apresentaram casos confirmados da doença, que está se difundindo para outras regiões do estado, inclusive com casos autóctones identificados na cidade de São Paulo, desde 2005 (BRASIL, 2006).

Quanto ao ciclo biológico de *L. (L.) chagasi*, a transmissão é feita pela picada dos vetores, que ingerem os macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania*, durante o repasto sanguíneo. Posteriormente, passam à forma promastigota, que multiplicam-se e diferenciam-se no intestino do inseto. Em seguida, a forma infectante (promastigota metacíclica) migra para a probóscide do inseto e é inoculada na pele do hospedeiro vertebrado. Na epiderme do hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas e no vacúolo parasitóforo dos macrófagos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento destas células. No meio extracelular elas são fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo, levando a disseminação sistêmica do parasito (REY, 2001; BRASIL, 2006).

2.2 Sinais clínicos e alterações histopatológicas

Os cães infectados apresentam sinais clínicos variados, desde um estado aparentemente saudável até a caquexia severa. Na LVC, os sinais clínicos são febre irregular de longo curso, palidez de mucosas e emagrecimento progressivo, até o estado de caquexia, na fase terminal. Podem apresentar ainda alterações cutâneas, tais como, alopecia focal ou generalizada; ulcerações crostosas no espelho nasal, orelhas e extremidades; despigmentação cutânea e áreas de hiperqueratose, principalmente em locais correspondentes a saliências ósseas; nódulos cutâneos ulcerados ou não, decorrentes da multiplicação das formas amastigotas do parasito associados a processo inflamatório local. Outros sinais incluem: onicogribose, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, paresia dos membros pélvicos, ascite, edema de extremidades, epistaxe, vômitos, alterações oculares, miotrofia, hepatoesplenomegalia, glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial. A insuficiência renal é muitas vezes a principal causa de morte em cães com Leishmaniose Visceral (MARZOCHI et al., 1985; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; ASHFORD, 2000).

Na LVC, a histopatologia está principalmente associada à hipertrofia e hiperplasia das células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM), sendo os macrófagos o alvo principal do protozoário. Os principais órgãos atingidos são os ricos em células do SFM, como os linfonodos, baço, fígado, pele e medula-óssea (TAFURI et al., 1996; TAFURI et al., 2001; LIMA et al., 2004).

O fígado é um órgão essencial ao organismo pela sua capacidade de síntese, excreção e por atuar como um órgão do sistema imune inato, devido à capacidade de apresentar um complexo sistema de defesa contra antígenos (STALKER e HAYES, 2007). Na LVC, o fígado dos cães infectados geralmente apresenta-se aumentado de volume, devido à inflamação na cápsula hepática, espaços-porta, presença de granulomas no interior de lóbulos hepáticos (granulomas intralobulares), além de hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer (TAFURI et al. 1996; TAFURI et al., 2001; XAVIER et al., 2006; LIMA et al., 2007; GIUNCHETTI et al., 2008; MELO et al., 2009; REIS et al., 2009).

Sanchez et al. (2004) observaram que em cães assintomáticos os granulomas eram bem organizados e nos sintomáticos desorganizados e menos efetivos no controle da infecção. Além disso, Lima et al. (2007) observaram que cães assintomáticos apresentaram maior número de granulomas hepáticos que os sintomáticos. A infecção hepática teria capacidade de auto-resolução quando ocorre predomínio de células mononucleares (células de Kupffer, plasmócitos, linfócitos T CD4+ e CD8+), que determinam a capacidade do hospedeiro em eliminar o parasito.

O baço pode apresentar tamanho normal ou aumentado, porém a esplenomegalia é o aspecto macroscópico mais marcante, devido ao infiltrado inflamatório crônico e à elevada densidade de parasitos (REIS et al., 2009). Nesse órgão ocorre diminuição das células da bainha periarteriolar (depleção das áreas T dependentes) com proliferação de macrófagos parasitados. A hiperplasia da polpa vermelha ocorre pela proliferação de macrófagos, às vezes formando agregados ou nódulos celulares intensamente parasitados (GENARO, 1993; TAFURI et al., 1996). A presença de infiltrado plasmocitário também é um achado frequente (TAFURI et al., 1996).

2.3 Resposta imune do cão

Os fatores que determinam a susceptibilidade ou resistência à Leishmaniose Visceral são ainda pouco definidos, mas a genética do hospedeiro pode ser um fator importante (PEARSON e SOUSA, 1996). O grau de intensidade clínica e a evolução da doença estão relacionados ao equilíbrio das respostas imune celular e humoral no cão infectado (BRITO, 2006).

Em cães assintomáticos, a infecção por *L. (L.) chagasi* geralmente promove a doença sistêmica crônica. No entanto, a evolução pode ser aguda e grave, levando o animal a óbito em poucas semanas. Por outro lado, a doença pode tornar-se latente e evoluir para a cura clínica espontânea (GENARO, 1993). Nos cães sintomáticos observa-se redução de linfócitos T CD4+ concomitante com a

proliferação do parasito nos macrófagos, o que sugere ausência de resposta imune efetiva para o controle da multiplicação do parasito (CORRÊA et al., 2007).

Na LVC, a resistência à infecção pelo protozoário (animais assintomáticos) dependerá da resposta Th1, a qual está associada à produção de citocinas como INF- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, além de proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+. Por outro lado, a ocorrência de lesões sistêmicas está diretamente relacionada com a resposta imune do hospedeiro e à evolução da doença. O surgimento dos sinais clínicos em cães susceptíveis (sintomáticos) deve-se ao desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2, com proliferação de linfócitos B e produção das citocinas IL4, IL5, IL6, IL10, que irão promover uma plasmocitose. Essa resposta leva a hipergamaglobulinemia, que contribui para a formação de imunocomplexos e, conseqüentemente, a resposta humoral ineficiente (BARBIÉRI, 2006).

Cães sintomáticos apresentam alterações no perfil imunológico envolvendo linfócitos T, com ausência de hipersensibilidade do tipo tardia, diminuição de células mononucleares no sangue periférico e ausência da produção de INF- γ , TNF- α e IL-12 pelas células mononucleares do sangue periférico (LUNA et al., 1999; SANTOS-GOMES et al., 2002; BARBIÉRI, 2006). A ativação de macrófagos por citocinas derivadas de linfócitos T CD4+ (Th1) leva a resistência à infecção, pela produção de INF- γ , TNF- α e IL-12 (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995) ou a susceptibilidade quando predominam citocinas Th2, produzidas por linfócitos T CD4 ativados por *L. (L.) chagasi*. Neste caso ocorre à sobrevivência do parasito e a exacerbação das lesões, em razão das ações supressivas das citocinas TGF- β , IL-10 e IL-4, sobre os macrófagos (BARBIÉRI, 2006; CORRÊA et al., 2007; ALVES et al., 2009).

Leishmania utiliza outros mecanismos que auxiliam nas estratégias de escape da defesa do hospedeiro, tais como: a modulação da produção de citocinas, por meio da inibição/desativação de macrófagos, pela supressão da produção de citocinas, bem como, da inibição da apresentação de antígenos e da estimulação de células T. O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é importante para a estimulação de linfócitos T e é constituído por proteínas específicas de membrana (HALLORAN et al., 1986). A ineficiente apresentação de antígenos se dá pela supressão, internalização e degradação de moléculas de MHC classe II (LEÃO et al.,

1995; BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998; CUNNINGHAM, 2002). Alguns estudos têm mostrado que *L. donovani* inibe a apresentação de antígenos, por meio da inibição da expressão de genes de MHC classe II (REINER et al., 1987). Por outro lado, na leishmaniose tegumentar, macrófagos infectados com *L. amazonensis* expressaram níveis normais de MHC classe II (LANG et al., 1994), mostrando um comportamento diferenciado entre as várias espécies de *Leishmania*.

Na imunidade inata além dos macrófagos, as células Natural Killer (NK) podem desempenhar um papel importante na defesa do hospedeiro contra injúrias. Estas células foram primeiramente descritas por Wisset e colaboradores em 1976, os quais denominaram estas células pelos seus grânulos citoplasmáticos, que no idioma holandês significam “cachos de uva”, porém apenas em 1983, Kanena e colaboradores sugeriram a hipótese de estas células possuírem atividade citotóxica (*apud* LUO et al., 2000). As células NK são linfócitos que atuam no combate às infecções virais e em células tumorais, pela sua ação citotóxica, sem a necessidade de reconhecimento prévio de um antígeno específico. Elas são ativadas por citocinas, por estimulação dos receptores de imunoglobulinas e pelos receptores de ativação ou inibição, específicos das células NK (LUO et al., 2000).

No fígado as células NK são chamadas de “células Pit”, pois apresentam grânulos citoplasmáticos semelhantes a caroços de frutas, tais como, cerejas, ameixas, pêssegos, tâmaras, mangas e damascos (GAO et al., 2009). As células Pit são encontradas nos sinusóides hepáticos, aderidas às células endoteliais e mantém contato com as células de Kupffer. Os pseudópodes destas células podem penetrar nas fenestras das células endoteliais, entrarem no espaço de Disse e contactar diretamente os microvilos dos hepatócitos. A proporção destas células no tecido hepático é de cerca de uma célula Pit para dez células de Kupffer (LUO et al., 2000).

No fígado, as células de Kupffer e as células Pit estão intimamente relacionadas aos sinusóides e são as responsáveis pela defesa do fígado. As células Pit são ativadas de imediato frente a um patógeno e, são grandes linfócitos granulares que atuam como células natural killer, com atividade citotóxica. As células de Kupffer são histiócitos hepáticos que têm importante função na regulação da inflamação e no reparo tecidual (STALKER e HAYES, 2007).

A expressão aumentada das células NK pode ajudar na manutenção da resposta imune. Este padrão de resposta é provavelmente o responsável pela maior resistência do tecido hepático (DUARTE et al., 2008). Estas células partilham uma origem comum com os linfócitos T e originam-se da medula óssea. Elas não destroem os microorganismos diretamente, mas atuam sobre células infectadas ou neoplásicas por meio de mecanismos semelhantes aos usados pelos linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos), pela degranulação e liberação de enzimas que ativam os mecanismos de apoptose da célula atacada. Elas são caracterizadas pela presença de receptores CD56 e ausência de CD3 (LUO et al., 2000; KORBEL et al., 2004).

A morte celular programada vem sendo descrita desde 1828, quando os pesquisadores observaram a regressão fisiológica de estruturas durante o desenvolvimento de fetos e larvas. No entanto, o termo apoptose foi descrito na literatura biomédica apenas em 1972, para definir células que morrem como parte de um programa normal de desenvolvimento celular. Sua adequada regulação mostra-se importante para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos normais (apud Kerr et al. (1972) em COTTER, 2009).

A apoptose pode ser um mecanismo útil ou danoso ao hospedeiro, pois muitos patógenos a utilizam como uma via que permite a sua sobrevivência, por meio da inibição ou indução de apoptose em células do sistema imune. Por este fato, estes patógenos podem aumentar a resistência de células infectadas do hospedeiro à apoptose ou induzir apoptose de células linfóides, afetando com isso o perfil de citocinas produzidas e a regulação da sobrevivência do parasito. Infecções por parasitos intracelulares (*Trypanosoma cruzi*) podem direcionar a resposta de linfócitos T, pela apoptose de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, por meio de citocinas (IL-2 e IL-4), agravando a infecção (DOS REIS et al., 2007). Estudos experimentais com camundongos infectados com *T. cruzi* descrevem a apoptose de linfócitos T como um fator importante para a sobrevivência do protozoário dentro de macrófagos (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000). Também relata-se que a apoptose de linfócitos na Doença de Chagas teria como consequência a inibição da resposta Th1, que favorece o parasito. Da mesma forma, a liberação de moléculas pró-apoptóticas pelo protozoário, no meio extracelular, induziria a apoptose de macrófagos e a liberação de formas infectivas viáveis de *T. cruzi* (LOPES e DOS REIS, 2000).

Moreira et al. (2013), quando avaliaram a apoptose nos linfonodos, notaram que não havia diferenças estatísticas significativas entre os grupos (sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos) de cães com LVC. Esta diferença foi observada somente entre estes e o grupo controle. Apesar da evidência biológica de associação entre o aumento da carga parasitária e a apoptose no grupo sintomático, não houve correlação significativa entre estes parâmetros. Possivelmente, *L. (L.) chagasi* poderia utilizar-se de mecanismos de evasão imune, por participar da indução da atrofia linfóide em animais com quadro clínico mais grave. Da mesma forma poderia estimular a intensa inflamação granulomatosa, como foi observado por Bandarra (2010), que verificou maior imunomarcção da citocina MIF (Fator de Inibição da Migração de Macrófagos) em macrófagos de cães com LVC, principalmente do grupo sintomático. As maiores médias de células imunomarcadas tiveram uma correlação positiva com a carga parasitária nestes animais, inclusive com imunomarcção de formas amastigotas do parasito para MIF. Esta citocina favorece a permanência dos macrófagos no sítio da injúria, considerando que esta é a principal célula alvo do parasita, o autor sugeriu um mecanismo de evasão imune do parasito.

Na literatura sobre LVC destaca-se um padrão de resposta imune específico ou diferenciado em cada órgão parasitado por *Leishmania*. Por este fato seria interessante avaliar o perfil de resposta inflamatória (linfócitos, macrófagos e células NK), de detecção de MHC-II e das citocinas TGF- β e TNF- α , no baço e fígado de cães com LVC, nos diferentes estádios clínicos da doença e comparados a um grupo controle. Estes resultados poderiam contribuir para o entendimento da complexa patogenia da enfermidade e para a identificação de um perfil de resistência ou susceptibilidade em cada compartimento do organismo do cão com LVC.

III. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo analisar o fígado e o baço de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, oriundos do município de Araçatuba (SP), área endêmica para Leishmaniose Visceral Canina. Para tanto, procura-se:

- Avaliar a presença de células Natural Killer; células em apoptose e células expressando MHC de classe II;
- Avaliar a presença das citocinas TGF- β e TNF- α ;
- Analisar o perfil celular de macrófagos e linfócitos;
- Determinar a densidade destas células entre os diferentes órgãos analisados;
- Associar as imunomarcações para *Leishmania* sp., macrófagos, linfócitos, TGF- β , TNF- α , MHC-II, apoptose e células Natural Killer entre si, em cada órgão, dentro de grupo;
- Comparar estes achados com o estadiamento clínico dos cães.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Material

Neste estudo foram avaliados 71 cães adultos oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (SP), região endêmica para Leishmaniose Visceral Canina, sem predileção por raça ou sexo. Os animais encaminhados por proprietários ou capturados nas ruas da cidade são submetidos à eutanásia diariamente neste local, devido a diagnóstico positivo para LVC, feito por ELISA ou punção biópsia aspirativa do linfonodo ou medula óssea.

Os cães foram submetidos à eutanásia, sob anestesia barbitúrica (Tiopental, Cristália Itapira, SP), conforme recomenda o código de ética para uso de animais em pesquisa científica (AVMA, 2001), mediante injeção intravenosa de cloreto de potássio¹.

No exame externo dos cadáveres foram avaliadas as alterações macroscópicas que permitiram classificá-los nos grupos deste estudo. A classificação do Ministério da Saúde (Brasil, 2006) foi considerada para formação dos grupos: cães sintomáticos (grupo S, n=31), com mais de três sinais clínicos, tais como, lesões de pele, onicogribose, emagrecimento ou caquexia, linfadenomegalia generalizada; cães oligossintomáticos (grupo O, n=23), com até três sinais clínicos, tais como, linfadenomegalia e discreta perda de peso; cães assintomáticos (grupo A, n=17), com ausência de sinais clínicos de LVC.

Um grupo composto por 10 cães hígidos, oriundos de área não endêmica para LVC foi utilizado como controle. Os cães foram considerados negativos pela técnica de qRT-PCR dos órgãos analisados. O fígado e baço destes cães eram oriundos da rotina de necropsias do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP, do Câmpus de Jaboticabal.

¹ O delineamento experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº. 028220/12).

Os fragmentos coletados do baço e do fígado foram submetidos à análise histopatológica e imuno-histoquímica.

4.2 - Análise Histopatológica

Foram colhidos fragmentos de fígado e baço, para análise em microscopia de luz. Os fragmentos foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos 0,15 Molar de pH 7,2. Após 24 horas de fixação foram desidratados em soluções de concentração decrescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina de acordo com a técnica histológica de rotina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm e corados com hematoxilina e eosina, para posterior identificação das principais alterações morfológicas. Estes órgãos foram avaliados de acordo com o padrão e intensidade da resposta inflamatória. Esta avaliação foi feita por escores: ausente (0); discreta (1); moderada (2) ou acentuada (3). As lesões eram discretas quando se observavam pequenos focos de inflamação nas áreas estudadas do baço e do fígado. A classificação moderada correspondia a lesões maiores, que poderiam ser multifocais a localmente extensas. As lesões acentuadas envolviam grande parte das áreas anatômicas avaliadas, muitas vezes com coalescência entre elas. No fígado considerou-se as regiões portal, centrolobular e intralobular, já no baço a cápsula esplênica, a polpa branca e a vermelha.

Os tipos celulares predominantes no infiltrado inflamatório esplênico e hepático foram avaliados por imuno-histoquímica (macrófagos, linfócitos...).

4.3 - Análise Imuno-histoquímica

O protocolo geral utilizado para todos os anticorpos foi: desparafinização dos cortes de fígado e baço em estufa a 60°C / 1 hora. Após essa etapa, as amostras foram hidratadas em soluções decrescentes de xilol e álcool, até um banho em água

destilada. Posteriormente fez-se a recuperação antigênica (Tabela 1), o bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução a 8% (92 mL de álcool metílico e 8 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes) por 20 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura. Após fez-se o bloqueio das reações inespecíficas (Protein Block, Dakocytomation, cód. X0909) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram incubados com anticorpos primários cada um com sua diluição e tempo de incubação específicos (Tabela 1). Após, os cortes foram incubados com diferentes anticorpos secundários (Tabela 1). Entre cada um dos passos descritos fez-se banhos em água destilada e em solução tampão Tris HCl, pH 7,4. Para a visualização da reação utilizaram-se os cromógenos DAB (3,3-diaminobenzidina – Dakocytomation, cód. K3468-1) ou Permanent Red (Kit Envision Fosfatase Alcalina - Dakocytomation, cód. K5355). A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan (Merck).

Os controles negativos das diferentes imunomarcações foram realizados com o diluente de anticorpo (Dakocytomation, código S302283-2), em substituição ao anticorpo primário. Os controles positivos foram feitos com tecidos sugeridos pelos fabricantes de cada anticorpo. Para os anticorpos CD56 (células NK), caspase 3 clivada (apoptose), CD3 (linfócitos T) utilizou-se a tonsila canina. Para MAC387 (macrófagos) e HLA-DR cadeia α (MHC-II) utilizou-se baço canino. E a imunodeteção das citocinas TNF- α e TGF- β teve como controle positivo o linfonodo de cão.

Para a determinação do número de células imunomarcadas utilizou-se cinco campos microscópicos (Nikon Eclipse E200) com a objetiva de 40x (MOREIRA et al., 2010), a qual apresenta uma área de aproximadamente 0,19625 mm². No baço consideraram-se as regiões de polpa branca e polpa vermelha. No fígado, a escolha das áreas foi aleatória. A partir dos valores obtidos nestes campos, fez-se uma média do número de células imunomarcadas por fragmentos de tecido de cada animal, sendo essas médias avaliadas em cada grupo de cães infectados (assintomático, oligossintomático e sintomático).

TABELA 1. Anticorpos primários e secundários utilizados nos cortes de fígado e baço de cães com Leishmaniose Visceral.

<i>Anticorpos primários</i>	<i>Estruturas imunomarcadas</i>	<i>Espécies de origem</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Diluição</i>	<i>Tempo de incubação</i>	<i>Anticorpos secundários</i>
Anti-leishmania ¹	Formas amastigotas	Canina	Panela a vapor Philips Walita ³	1:1000	18 horas (-4°C)	LSAB ⁶
Anti-CD56	Células Natural Killer	Mouse monoclonal (BIOCARE, cód. CM164C)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ⁴	1:75	2 horas a temperatura ambiente	Advance ⁷
Anti-caspase 3 clivada ²	Células em apoptose	Rabbit policlonal (Cell Signaling, cód. 9661)	Panela a vapor Philips Walita ³	1:200	18 horas (-4°C)	LSAB ⁶
Anti-macrófagos	Macrófagos	Mouse monoclonal (MCA 874G, AbD Serotec, cód. Batch 1209)	Panela a vapor Philips Walita ³	1:3500	18 horas (-4°C)	LSAB ⁶
Anti-CD3	Linfócitos T	Mouse monoclonal (Dako, cód. M7254)	Panela a vapor Philips Walita ³	1:200	18 horas (-4°C)	LSAB ⁶
Anti-HLA-DR, cadeia α	Células expressando MHC II	Mouse monoclonal (Dako, cód. M0746)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ⁴	1:600	18 horas (-4°C)	Envision ⁸
Anti-TNF- α	Células expressando citocina TNF- α	Mouse monoclonal (SANTA CRUZ, cód. SC-80386)	Microondas ⁵	1:25	18 horas (-4°C)	LSAB ⁶
Anti-TGF- β	Células expressando citocina TGF- β	Rabbit policlonal (SANTA CRUZ, cód. SC-146)	Microondas ⁵	1:1000	18 horas (-4°C)	Envision Fosfase Alcalina

1 - Soro de cão positivo para Leishmaniose Visceral (MOREIRA et al. 2010, modificado do protocolo descrito por TAFURI et al., 2004); 2 - Protocolo de Moreira et al. (2013); 3 - Solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0, por 40 minutos; 4 - Solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0; 5 - Solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0, por 2 minutos na potência máxima e 10 minutos na potência mínima (750W), abrindo a cada 5 minutos para repor o tampão; 6 - Complexo Estreptavidina Peroxidase (kit LSAB – Dakocytomation, cód. K0690-1); 7 – Kit Advance HRP® (Dako Cytomation, código K406889-2); 8- Envision Dual Link System-HRP (Dako Cytomation, código K406189-2).

4.4 - Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se as médias das imunomarcações de cada anticorpo estudado nos fragmentos de fígado e baço, e as diferenças entre os grupos de cães infectados pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P < 0,05$). Da mesma forma, para a determinação do perfil de células inflamatórias predominantes no infiltrado foi utilizado o mesmo teste, com a comparação entre os grupos de cães infectados. As análises foram feitas no programa Graphpad Prism (versão 4.00, 2003).

Para as correlações de cada imunomarcacão com a carga parasitária de cada órgão por grupo e as correlações entre os órgãos estudados, realizou-se o Coeficiente de Correlação de Spearman, considerando $P < 0,05$, utilizando o programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

V. RESULTADOS

5.1 - Análise Anatomopatológica

No exame externo dos animais sintomáticos, as lesões mais frequentes foram: áreas de alopecia, descamação, presença de crostas e ulceração na pele, que variavam de distribuição local a disseminada, sendo, o ouvido externo, a região periocular e as extremidades dos membros os locais mais frequentemente envolvidos. Notou-se também conjuntivite, caquexia e onicogribose. Nas alterações anatomopatológicas observou-se linfadenomegalia, esplenomegalia (bordas arredondadas), áreas de espessamento da cápsula esplênica e evidência da polpa branca ao corte, além de congestão. No fígado observou-se hepatomegalia (bordas arredondadas), coloração pálida a amarelada (degeneração) ou vermelho-escura (congestão) e ao corte padrão lobular evidente.

Nos cães oligossintomáticos observou-se apenas um aumento de volume generalizado de linfonodos e, por vezes, áreas de descamação cutânea; já nos animais assintomáticos havia ausência de lesões e sinais clínicos.

5.2 - Análise Histopatológica

Nas amostras analisadas do fígado e do baço observou-se reação inflamatória, com graus variados de intensidade, com diferenças marcantes entre estes compartimentos hepáticos e esplênicos.

No fígado, a inflamação foi sempre mais discreta em relação ao baço. O perfil celular predominante foi de linfócitos, macrófagos e plasmócitos respectivamente. Os linfócitos apareciam em maior densidade, associados aos granulomas. Os granulomas apresentavam limites bem definidos, eram de intensidade discreta a moderada e localizavam-se nas regiões centrolobular, portal (Figura 1A) e

intralobular. Poucos cães apresentaram reação inflamatória granulomatosa com presença de parasitos visíveis no interior de macrófagos, pela coloração de Hematoxilina e Eosina. No restante do parênquima hepático havia degeneração e congestão em graus variados de intensidade, bem como a presença de células de Kupffer mais hipertrofiadas e evidentes, de aspecto reativo.

No baço, a polpa branca apresentou reatividade linfóide, que variou de discreta a moderada, comprovada pelo aumento da celularidade no centro germinativo e pela presença de figuras de mitose. Este achado foi mais evidente em cães assintomáticos. Nos cães sintomáticos, a atrofia linfóide da polpa branca foi frequente e sempre associada à presença de linfócitos em apoptose.

A inflamação granulomatosa predominou na polpa vermelha (Figura 1B), com distribuição multifocal a difusa, neste último caso causava distorção da arquitetura esplênica e em um cão sintomático estava associada à fibrose circundando os granulomas.

Estes granulomas eram pobremente definidos, caracterizados por macrófagos hipertrofiados, que formavam agregados com limites imprecisos. A presença de linfócitos associados aos granulomas foi menos evidente, em comparação ao fígado. Os granulomas também foram observados na cápsula esplênica e mais raramente na polpa branca, com distribuição focal e intensidade discreta a moderada, principalmente no grupo S.

A presença de plasmócitos na polpa vermelha foi mais intensa que no grupo controle, principalmente nos cães sintomáticos. Muitos destes plasmócitos apresentavam corpúsculos de Russell intracitoplasmáticos.

Na polpa vermelha verificou-se a presença de metaplasia mielóide, composta por leucócitos imaturos, tais como linfoblastos, reticulócitos e megacariócitos, mais comum em animais com sinais clínicos de LV (grupos O e S).

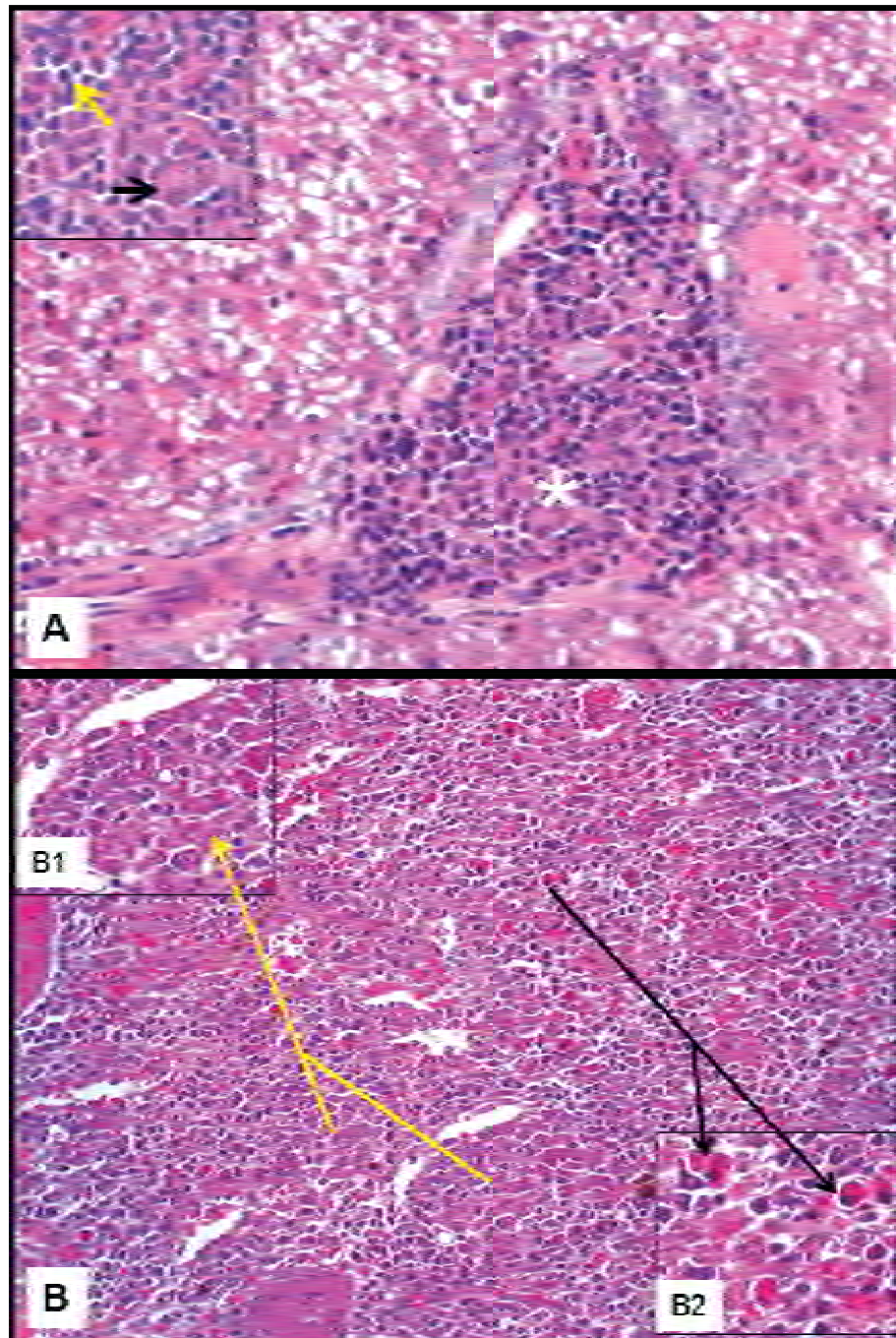


Figura 1. Fotomicrografia de fígado e baço de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Notar a presença de granuloma portal (* / Obj. 20x) e no detalhe a predominância de macrófagos (seta preta) e linfócitos (seta amarela / Obj. 40x). (B) Observar a presença de reação granulomatosa multifocal em polpa vermelha do baço (setas amarelas; Obj. 20x), que corresponde a granulomas associados a poucos linfócitos (B1). Na mesma região observa-se vários plasmócitos com corpúsculos de Russell intracitoplasmáticos (B2). Hematoxilina e Eosina.

Não houve diferença significativa no fígado (Figura 2A) para os escores de intensidade de inflamação nos três tipos celulares. No baço (Figura 2B) as diferenças apareceram entre os macrófagos e plasmócitos no grupo S (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn $P=0,0440$), e no grupo O notou-se diferença entre os macrófagos e plasmócitos, bem como, entre os linfócitos e plasmócitos (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn, $P<0,01$).

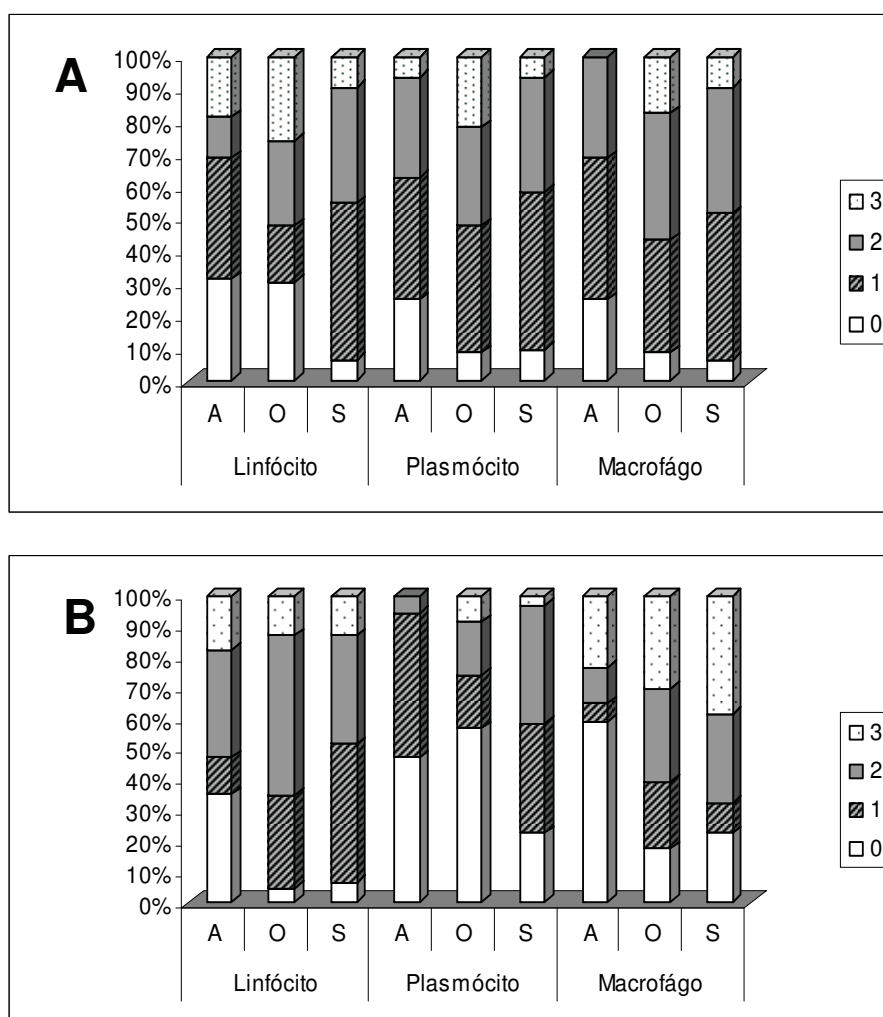


Figura 2. Frequência de escores de infiltrado inflamatório no fígado (A) e baço (B) nos grupos de cães infectados para Leishmaniose Visceral (A = assintomático, O = oligossintomático e S= sintomático).

Escores de intensidade de infiltrado inflamatório: sem alteração (0), discreta (1), moderada (2) e acentuada (3) para os tipos celulares macrófago e plasmócitos. Para os linfócitos considerou-se o seguinte escore: (0) atrofia linfóide, (1) discreta reatividade, (2) moderada reatividade, (3) acentuada reatividade linfóide.

5.3 Análise Imuno-histoquímica

Na análise da carga parasitária notou-se a imunomarcacão das formas amastigotas no citoplasma de macrófagos do fígado (Figura 3A) e do baço (Figura 3B), entretanto, não houve diferença significativa nestes órgãos entre os grupos de cães infectados (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn, $P > 0,05$) e nem na comparação entre os órgãos (Teste de Mann-Whitney, $P > 0,05$). A associação entre a carga parasitária hepática e esplênica foi significativa (0,4427; $P = 0,0126$) apenas nos cães sintomáticos, sendo o baço o órgão com maior carga parasitária.

As imunomarcações para células apoptóticas ocorreram no citoplasma das células, com predominância em linfócitos. No fígado, as células apoptóticas estavam presentes no infiltrado inflamatório (Figura 3C). No baço (Figura 3D) a densidade foi maior na transição entre a polpa branca e vermelha (camada do manto do corpúsculo esplênico), seguida da polpa vermelha. O centro germinativo apresentou ausência ou presença discreta de células apoptóticas. A densidade de células apoptóticas não diferiu entre os grupos de cães infectados, apenas entre estes e o grupo controle, no baço dos cães sintomáticos (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn, $P = 0,0303$ / Figura 4A) e no fígado dos cães oligossintomáticos (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn, $P = 0,0365$ / Figura 4B).

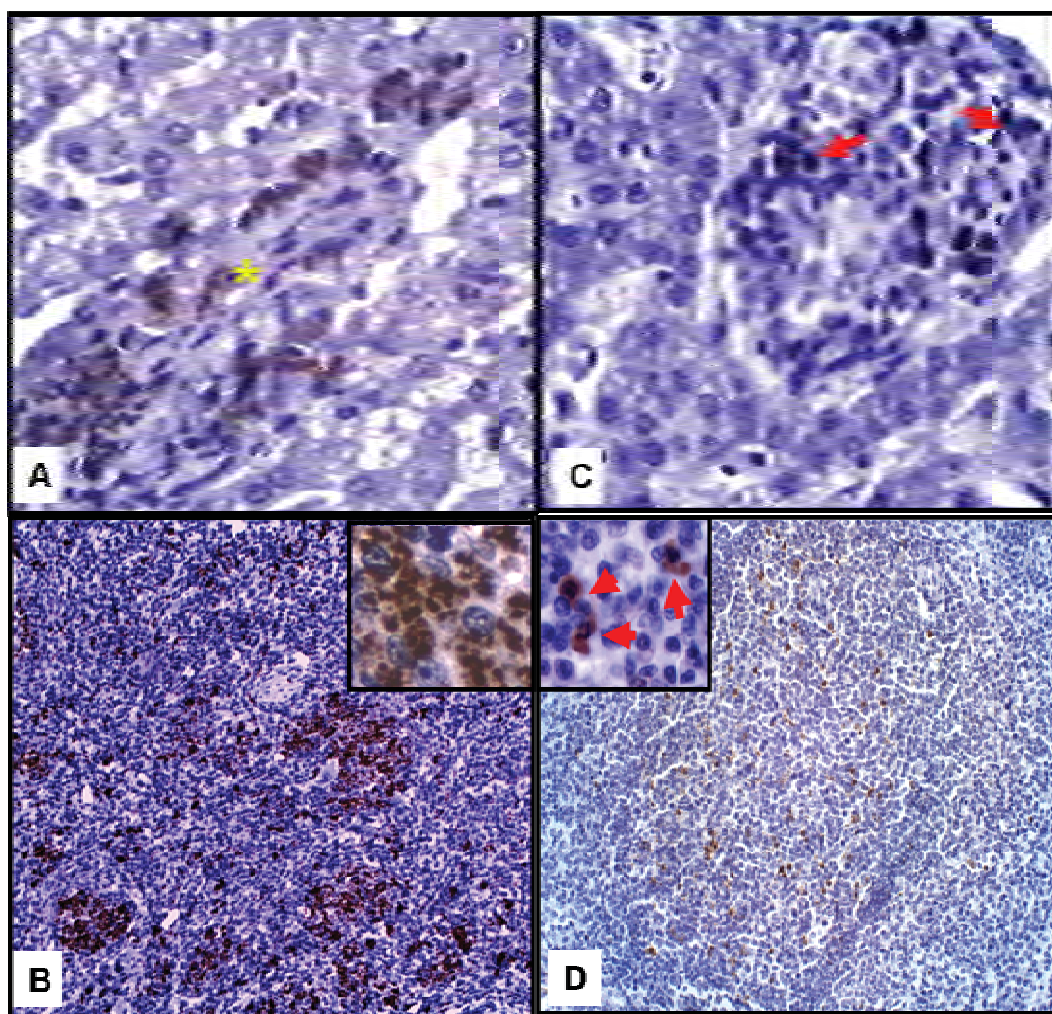


Figura 3. Fotomicrografia da imunomarcação de *Leishmania (L.) chagasi* e de apoptose no fígado e no baço de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Notar no fígado a marcação positiva do protozoário em macrófagos do infiltrado inflammat rio portal (* / Obj. 40x). (B) No baço, macrófagos parasitados aparecem na polpa vermelha (Obj. 20x). (C) No fígado observar linfócitos em apoptose no infiltrado portal (setas / Obj. 40x). (D) No baço os linfócitos em apoptose (Obj. 20x) aparecem no detalhe (setas). Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase.

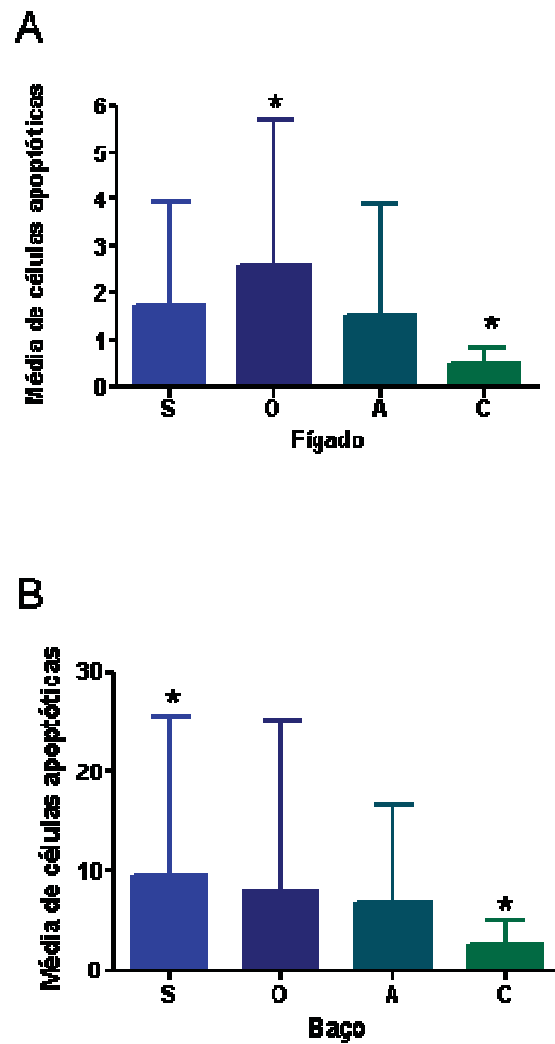


Figura 4. Média de células apoptóticas no fígado (A) e no baço (B) de cães com Leishmaniose Visceral. Notar a diferença significativa entre os grupos O e controle no fígado ($P=0,0365$) e entre os grupos S e controle no baço ($P = 0,303$). Testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Dunn. Grupos S: sintomático, O: Oligossintomático, A: Assintomático e C: controle.

A imunomarcagem das células Natural Killer (NK) pelo anticorpo anti-CD56 foi observada na membrana citoplasmática das células e também no citoplasma, de aspecto predominantemente granular, sendo que no fígado estas células estavam presentes de forma discreta, em meio ao infiltrado inflamatório portal, centrolobular e intralobular (Figura 5A). No baço, estas células apareciam em maior proporção na polpa vermelha e de forma discreta na região de polpa branca (Figura 5B). No fígado, os cães sintomáticos tiveram maior número de células NK, entretanto não houve diferença significativa entre os grupos de cães infectados (Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P > 0,05$). No baço essa diferença ocorreu nos cães do grupo O, o qual diferiu dos cães assintomáticos e do grupo controle (Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P < 0,05$ / Figura 6).

Os macrófagos apresentavam imunomarcagem citoplasmática, sendo os parasitados com marcação inexpressiva ou ausente. No fígado (Figura 5C), as células de Kupffer estavam imunomarcadas em grande número nos sinusóides.

No baço (Figura 5D), a presença de macrófagos foi maior nos granulomas da polpa vermelha e nos casos mais avançados nos granulomas difusos que invadiam a polpa branca e causavam a distorção da arquitetura do órgão. Nos granulomas esplênicos e hepáticos foi observada ausência de marcação para o anticorpo MAC387 em macrófagos parasitados (detalhe da Figura 5D). No fígado (Figura 7A) e no baço (Figura 7B) verificou-se diferença significativa do grupo S em relação aos grupos A, O e C para densidade de macrófagos (Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P < 0,0001$).

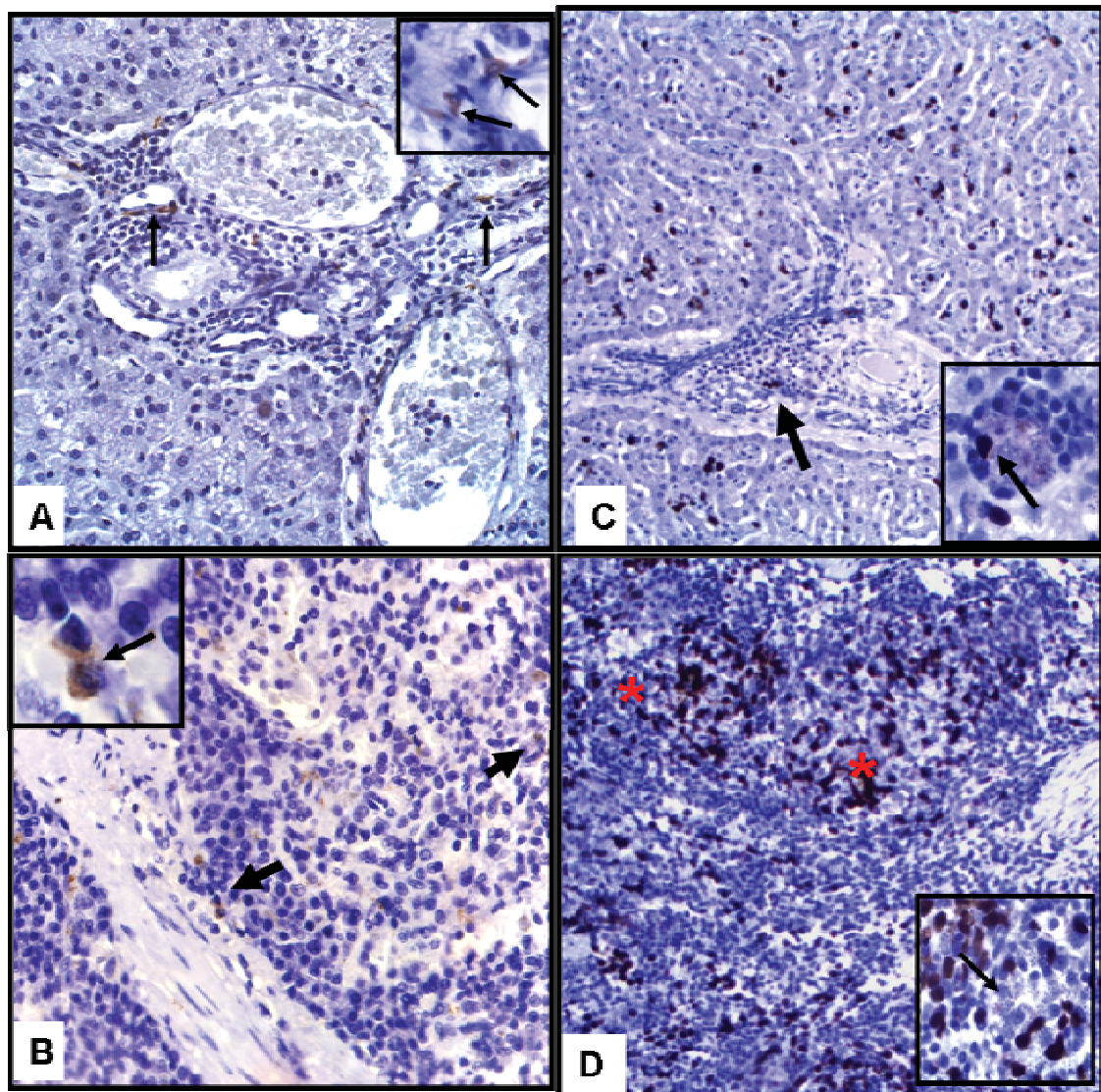


Figura 5. Fotomicrografia de imunomarcação positiva para o anticorpo anti-CD56 e anticorpo MAC387 (células NK e macrófagos respectivamente) em cães sintomáticos para Leishmaniose Visceral. (A) Notar a presença discreta de células NK no infiltrado inflamatório do fígado (setas). (B) Observar a imunomarcação de células NK na polpa vermelha do baço (setas / Complexo de polímero ligado a peroxidase / Obj. 40x). (C) Observar macrófagos positivos nos sinusóides e no infiltrado portal hepático (setas). (D) Notar a imunomarcação em região de polpa vermelha (*) esplênica e no detalhe ausência de marcação em macrófagos parasitados (seta / Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase / Obj. 40x).

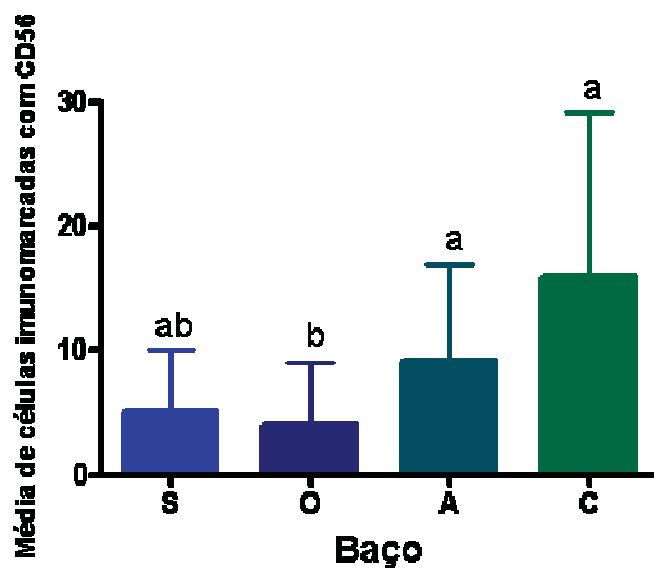


Figura 6. Média de células Natural Killer imunomarcadas com o anticorpo anti-CD56, no baço de cães com Leishmaniose Visceral. Notar a diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo O com os grupos A e C (controle). Testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Dunn. Grupos S: sintomático, O: Oligossintomático, A: Assintomático e C: controle.

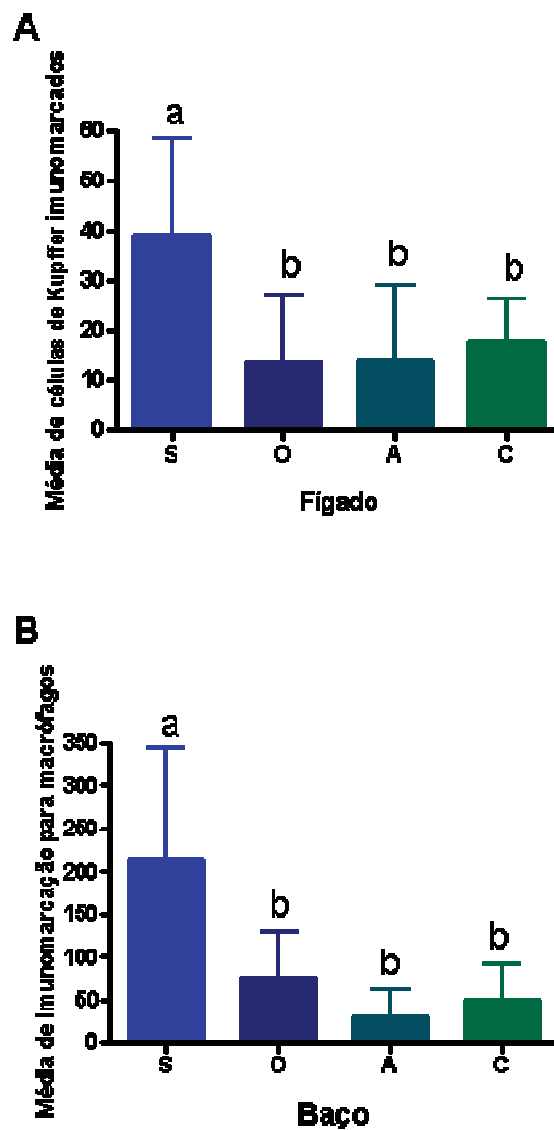


Figura 7. Média de imunomarcagem para macrófagos no fígado (A) e no baço (B) de cães com Leishmaniose Visceral Canina. Notar a diferença significativa ($P < 0,001$) entre o grupo S e os demais ($P < 0,0001$) no fígado e baço. Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn. Grupos S: sintomático, O: Oligossintomático, A: Assintomático e C: controle.

Os linfócitos T imunomarcados com o anticorpo anti-CD3, apresentaram imunomarcações na membrana citoplasmáticas das células. No fígado (Figura 8A) de cães sintomáticos a detecção estava presente nos granulomas, nos sinusóides e no infiltrado inflamatório. Nos cães oligossintomáticos e assintomáticos o infiltrado inflamatório foi discreto ou ausente e, os linfócitos eram observados com mais frequência nos sinusóides.

No baço (Figura 8B), os linfócitos estavam localizados predominantemente na polpa branca e de forma discreta e aleatória na polpa vermelha. Notou-se ainda que quando o órgão apresentava alta carga parasitária e uma severa inflamação granulomatosa, o número de linfócitos imunomarcados foi menor.

No fígado (Figura 9A) houve diferença para o número de linfócitos apenas entre os grupos S e controle (Teste de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P=0,0163$). Já no baço (Teste de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P=0,0003$ / Figura 9B) as diferenças significativas apareceram entre o grupo S e A e entre o S e o controle (Teste de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P<0,001$), sendo a menor densidade de linfócitos observada no grupo S.

A imunodeteção de MHC-II ocorreu na membrana citoplasmática de macrófagos dos granulomas, células de Kupffer e linfócitos. No fígado (Figura 8C) estas imunomarcações estavam presentes em maior proporção na inflamação granulomatosa. Nos cães sintomáticos também observou-se células expressando MHC-II aleatoriamente nos sinusóides e na membrana de formas amastigotas no interior dos macrófagos. No baço (Figura 8D) de cães sintomáticos esta marcação estava presente tanto na polpa vermelha quanto na polpa branca. Em alguns animais com macrófagos altamente parasitados verificou-se imunomarcação em formas amastigotas do interior dos macrófagos (Figura 8D).

No fígado (Figura 10A) verificou-se diferença significativa entre o grupo S e os demais (Teste de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P<0,05$). No baço (Figura 10B) essa diferença também ocorreu do grupo S para os demais grupos (Teste de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P<0,05$) e do grupo O para o C (Teste de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P<0,05$).

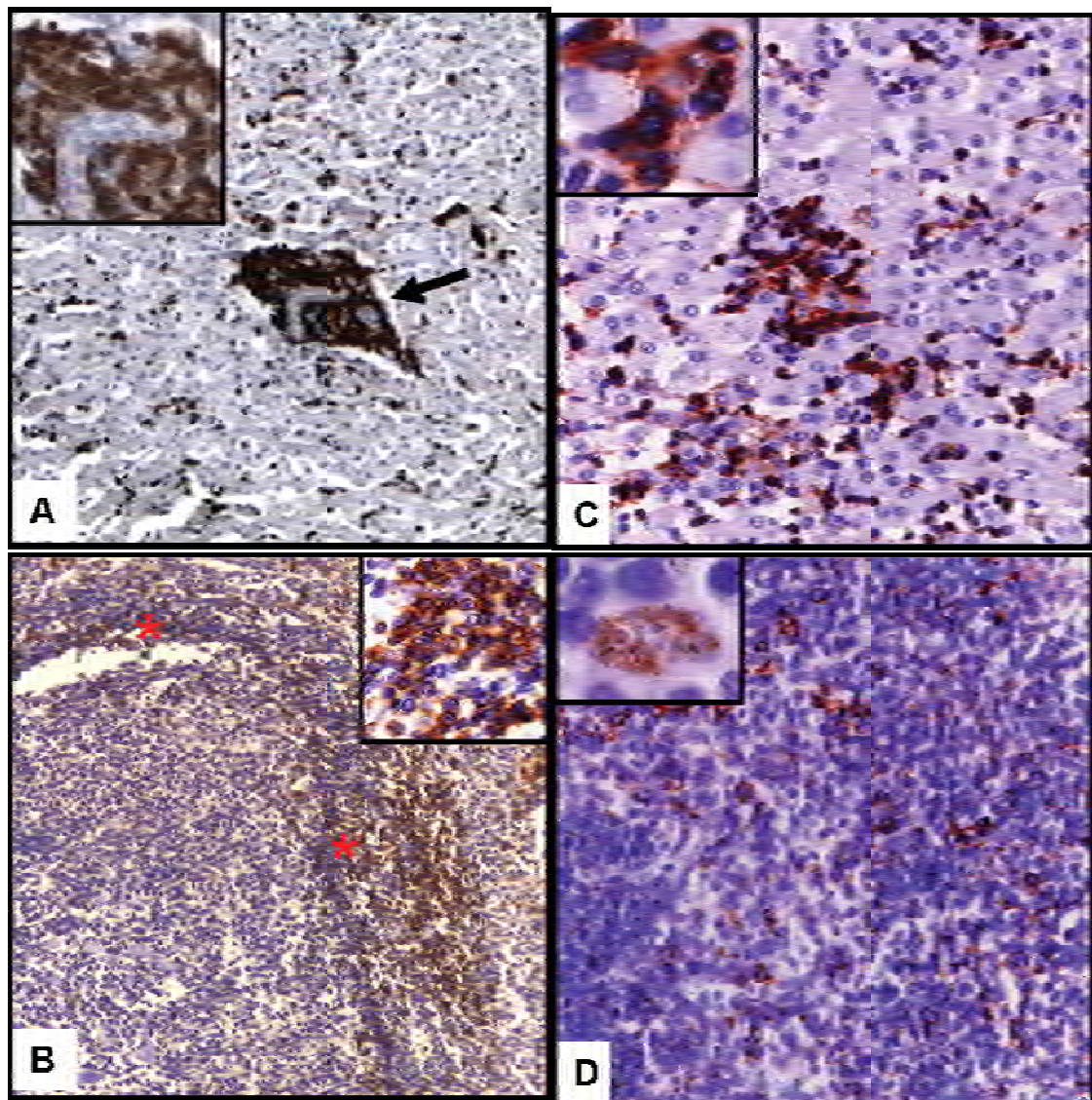


Figura 8. Fotomicrografia de imunomarcção de linfócitos T com o anticorpo anti-CD3 e de MHC-II com HLA-DR α em cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) No fígado observar linfócitos T nos sinusóides e no infiltrado portal (seta / Obj. 10x). (B) Notar a imunomarcção de linfócitos T em região de transição da polpa branca com a polpa vermelha esplênica (* / Obj. 20x / Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase). (C) No fígado a marcação para MHC II pode ser observada em células de kupffer dos sinusóides (Obj. 40x). (D) No baço verifica-se marcação MHC-II positiva em linfócitos (Obj. 40x). No detalhe verifica-se marcação de MHC-II em formas amastigotas intracitoplasmáticas em macrófagos. Polímero ligado a Peroxidase.

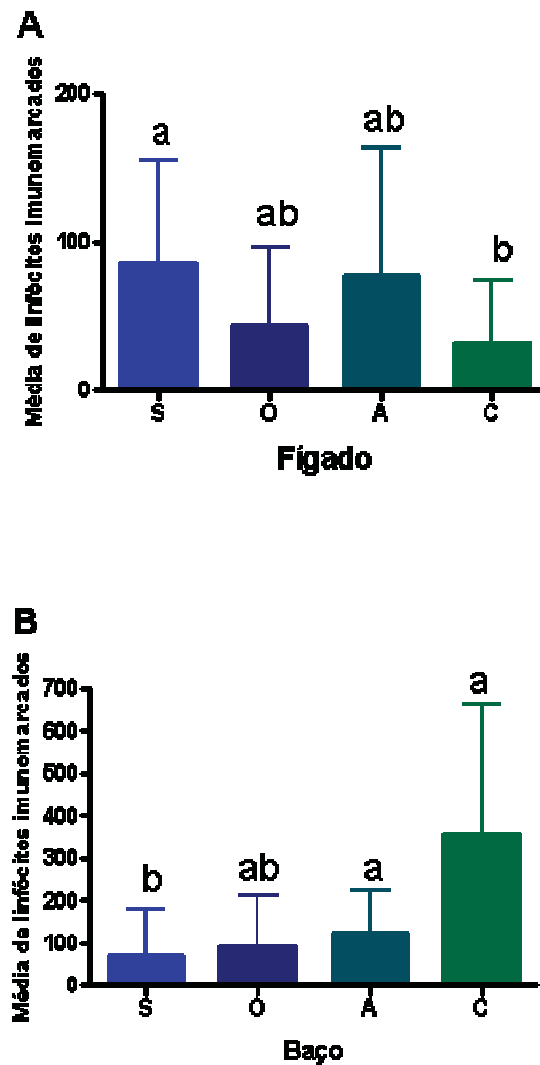


Figura 9. Média de linfócitos T imunomarcados no fígado (A) e no baço (B) de cães com Leishmaniose Visceral. Notar a diferença significativa entre o grupo S e o controle ($P=0,0163$). No baço essa diferença ocorreu entre os grupos S e A e S e C ($P<0,001$). Teste de Kruskal-Wallis e a comparação entre os grupos pelo teste múltiplo de Dunn. Grupos S: sintomático, O: Oligossintomático, A: Assintomático e C: controle.

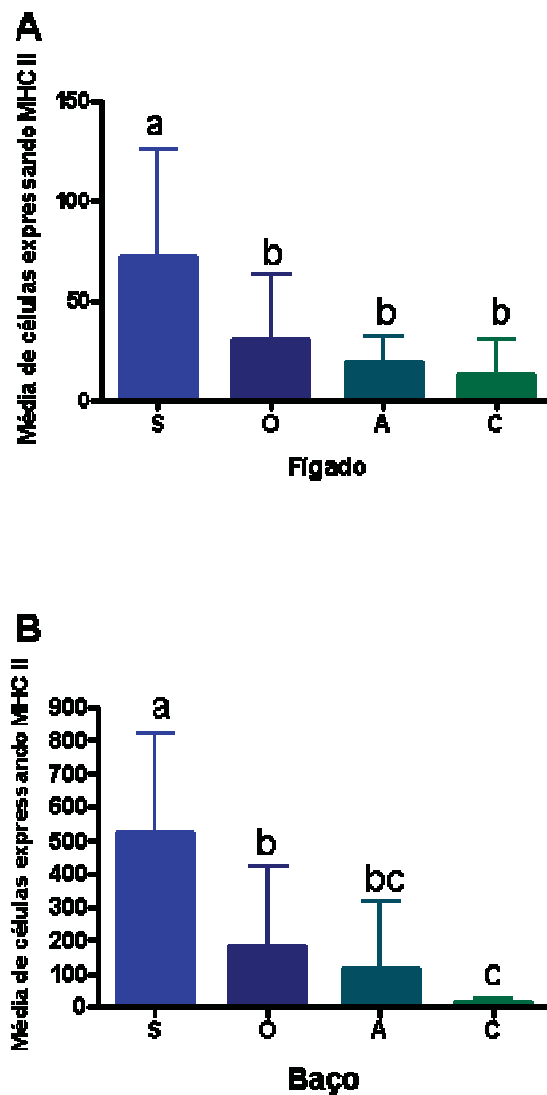


Figura 10. Média de células imunomarcadas expressando MHC II no fígado (A) e no baço (B) de cães com Leishmaniose Visceral. Notar a diferença significativa entre os grupos S e os demais grupos no fígado ($P < 0,05$). No baço essa diferença ocorreu entre o grupo S e os demais e entre o grupo O e o controle ($P < 0,05$). Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn. Grupos S: sintomático, O: Oligossintomático, A: Assintomático e C: controle.

A imunodeteção do TGF- β estava presente na membrana citoplasmática de macrófagos e linfócitos. No fígado (Figura 11A) notou-se maior frequência de células imunomarcadas nos sinusóides e em menor proporção no infiltrado inflamatório, tanto linfoplasmocitário como nos granulomas. No baço (Figura 11B) esta detecção foi maior na polpa vermelha.

No fígado (Figura 12A) a proporção de células positivas para esta citocina foi significativa entre os grupos S e A e entre S e controle (Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P < 0,01$). No baço (Figura 12B) houve diferença significativa de S com os demais grupos (Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P < 0,001$) e do grupo O para o controle (Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P < 0,05$).

A imunodeteção da citocina TNF- α foi observada com maior frequência na membrana citoplasmática de macrófagos e linfócitos. No fígado (Figura 11C) esta citocina estava localizada de forma discreta, porém em maior concentração nos granulomas. No baço (Figura 11D) a densidade de células positivas também foi discreta e observada principalmente na polpa vermelha.

No fígado (Figura 13A), os cães sintomáticos diferiram dos grupos O e A (Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P < 0,001$), bem como, o grupo A do controle (Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P < 0,05$). A mesma diferença ocorreu no baço (Figura 13B / Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, $P < 0,05$). Tanto no fígado quanto no baço, os cães assintomáticos foram os que apresentam maior imunodeteção desta citocina.

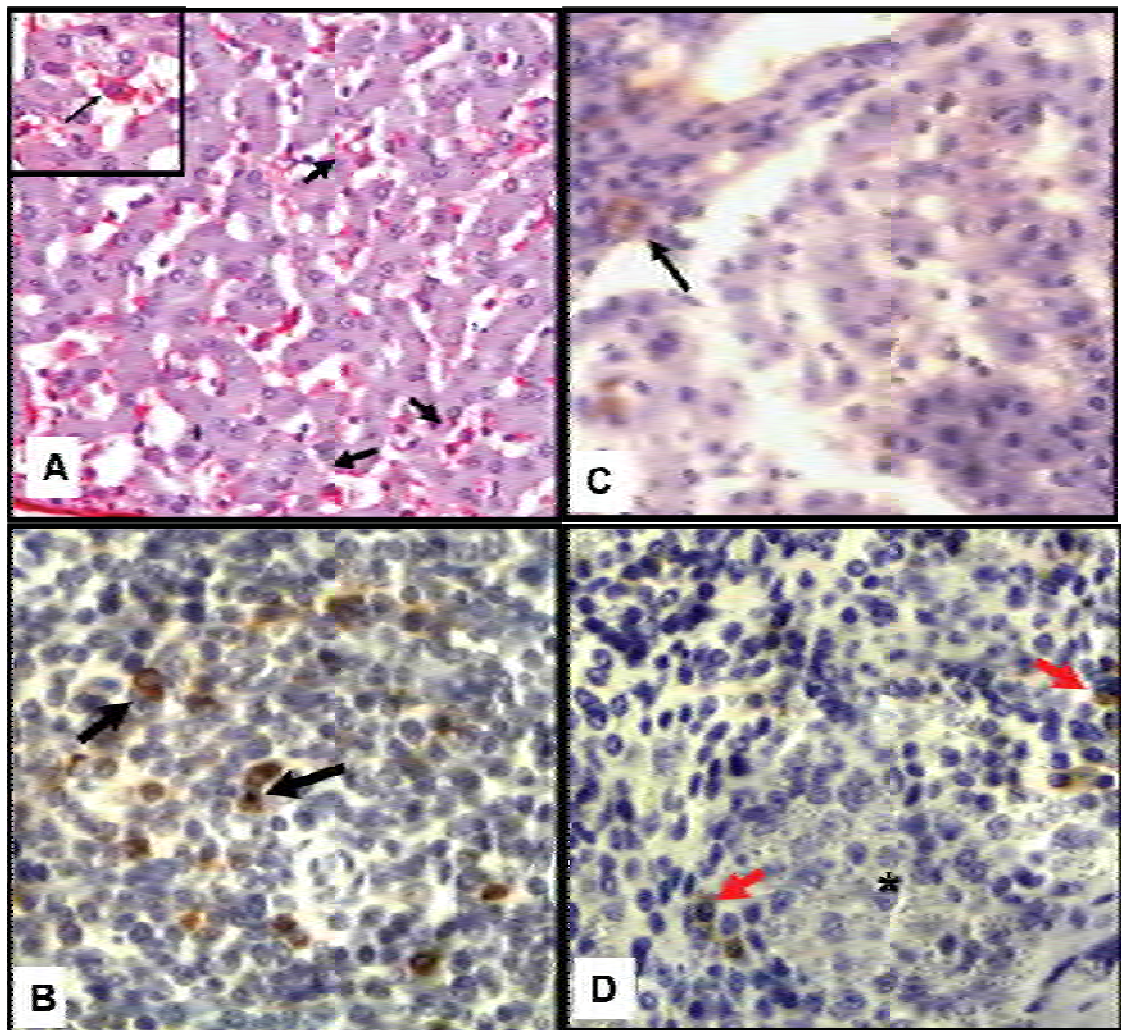


Figura 11. Fotomicrografia de imunomarcação de TGF- β e TNF- α em cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Marcação positiva para TGF- β nas células de Kupffer dos sinusóides hepáticos (setas / Polímero ligado a Fosfatase alcalina / Obj. 40x). (B) Marcação em linfócitos esplênicos (setas / Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase / Obj. 40x). (C) Marcação positiva para TNF- α em macrófago da região portal do fígado (seta). (D) Observar a imunomarcação em linfócitos (setas) ao redor de macrófagos parasitados de um granuloma esplênico (*). Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase (Obj. 40x).

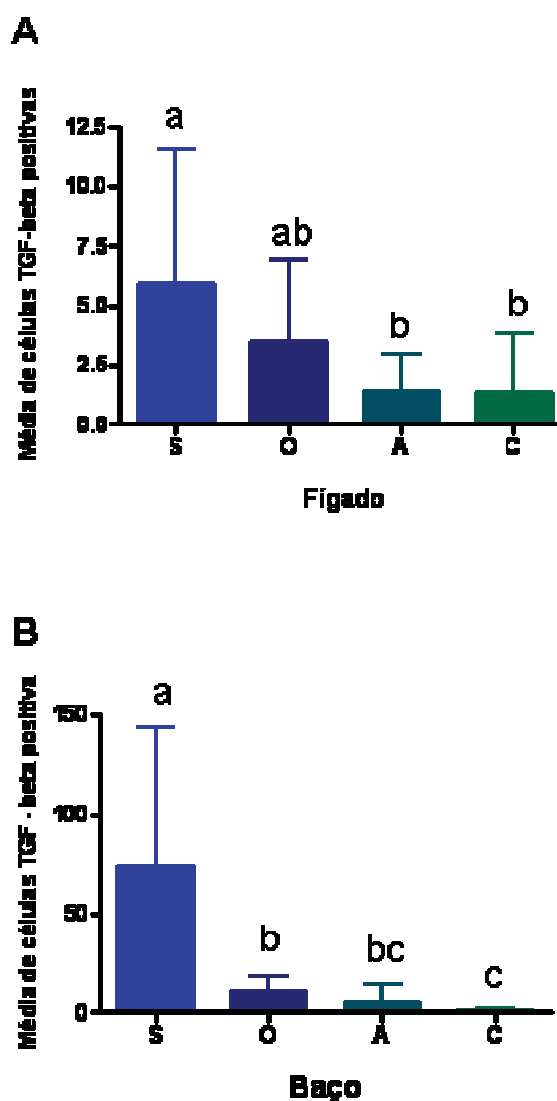


Figura 12. Média de células imunomarcadas expressando TGF- β no fígado (A) e no baço (B) de cães com Leishmaniose Visceral. No fígado houve diferença significativa entre o grupo S com A e S com controle ($P < 0,01$). No baço essa diferença ocorreu entre o grupo S com os demais ($P < 0,001$) e entre O com controle ($P < 0,05$). Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn. Grupos S: sintomático, O: Oligossintomático, A: Assintomático e C: controle.

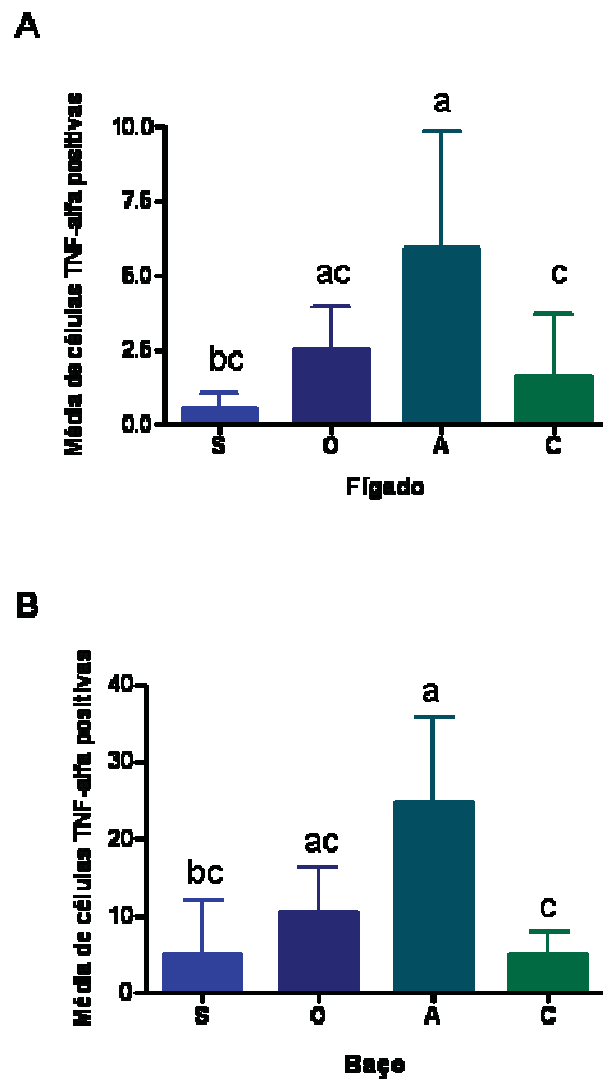


Figura 13. Média de células imunomarcadas expressando TNF- α no fígado (A) e baço (B) de cães com Leishmaniose Visceral. No fígado e baço, os cães do grupo S diferiram do O e A, e o grupo A do controle ($P < 0,05$). Testes de Kruskal-Wallis e de Dunn.

Para avaliar a correlação entre todas as variáveis obtidas por imunohistoquímica fez-se a comparação das mesmas entre si e com a carga parasitária e verificou se havia associação significativa quando $P < 0,05$ entre os órgãos dentro de cada grupo, utilizando-se o Coeficiente de Correlação de Spearman (Figura 18). Os coeficientes entre 0,65 a 1,00 apresentam correlação positiva forte; entre 0,30 a 0,65 apresentam correlação positiva média; entre 0,00 a 0,30 correlação positiva fraca. A correlação torna-se com os coeficientes negativos.

No fígado dos cães do grupo sintomático (Figura 18A) observou-se correlação entre carga parasitária e macrófagos ($P=0,0201$), apoptose e MHC-II ($P=0,0311$), apoptose e TNF- α ($P=0,0164$), macrófagos e células NK ($P=0,0357$), macrófagos e MHC-II ($P=0,0059$), linfócito e TGF- β ($P=0,0038$).

Nos cães do grupo oligossintomático, no fígado (Figura 18B), verificou-se correlação entre carga parasitária e linfócitos ($P=0,0313$), apoptose e linfócito ($P=0,0035$), apoptose e MHC-II ($P=0,0477$), apoptose e TGF- β ($P=0,0341$) e macrófago e MHC-II ($P=0,0126$).

No grupo assintomático observou-se no fígado (Figura 18C) correlação somente entre a carga parasitária e as células NK ($P=0,0216$) e entre macrófagos e linfócitos ($P=0,0379$).

No baço dos cães do grupo sintomático não houve correlação significativa entre as variáveis analisadas.

No baço dos cães do grupo oligossintomático (Figura 18D) houve correlação significativa entre carga parasitária e apoptose ($P=0,0353$), MHC-II e NK ($P=0,0057$) e NK e TNF- α ($P=0,0413$).

Nos cães do grupo assintomático, no baço (Figura 18E) notou-se correlações significativas entre apoptose e macrófagos ($P=0,0431$), MHC-II e TGF- β ($P=0,0015$) e entre NK e TNF- α ($P=0,0147$).

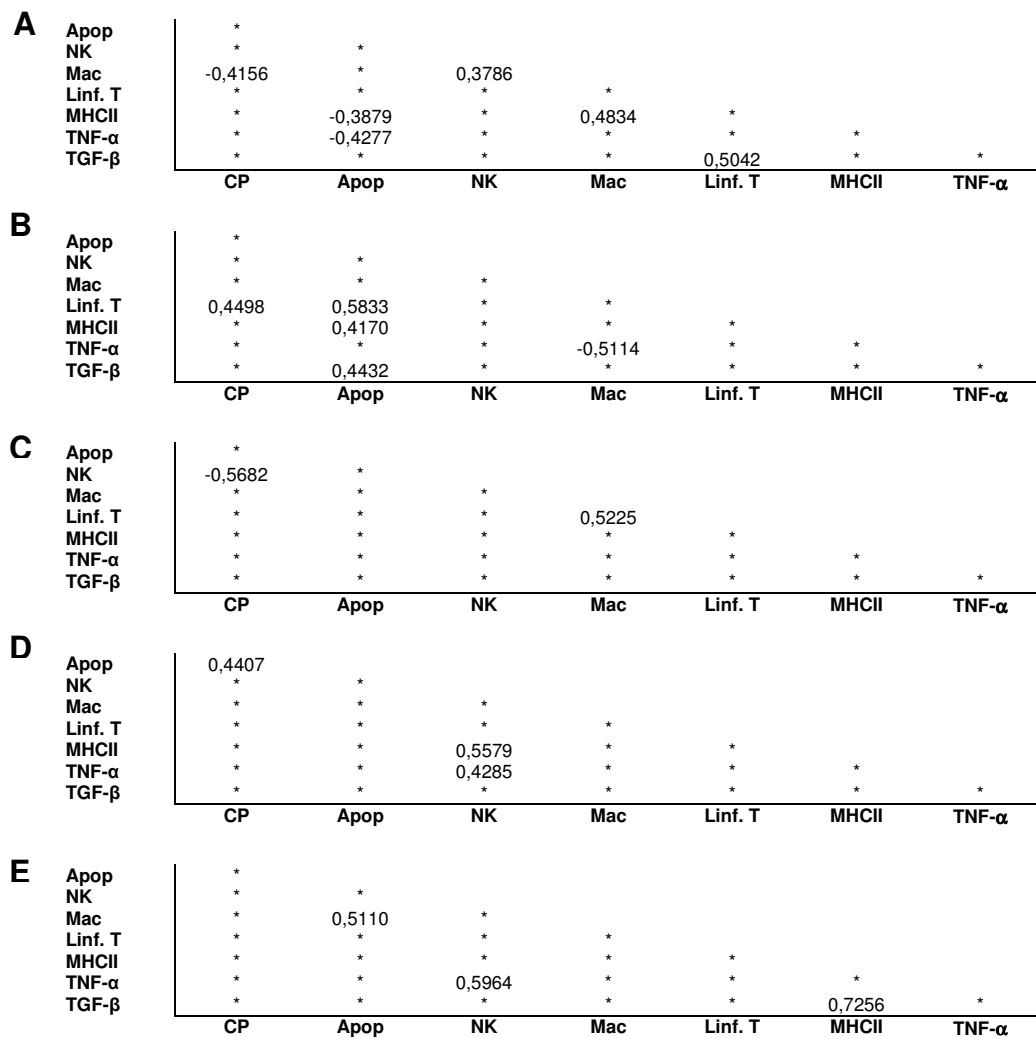


Figura 18. Determinação do coeficiente de correlação de Spearman entre todas as médias obtidas por imuno-histoquímica e a comparação das mesmas entre si e com a carga parasitária, entre os órgãos e dentro de grupo. A- Fígado de cão sintomático; B-Fígado de cão oligossintomático, C- Fígado de cão assintomático; D- Baço de cão oligossintomático; E- Baço de cão assintomático.

CP: carga parasitária; Apop: células em apoptose; NK: células Natural Killer; Mac: macrófagos; Linf. T: linfócitos T; MHCII: Complexo de histocompatibilidade principal classe II; TNF- α : Fator de necrose tumoral α ; TGF- β : Fator de transformação de crescimento β . Os coeficientes apresentados correspondem a $p < 0,05$. Os coeficientes entre 0,65 a 1,00 apresentam correlação positiva forte; entre 0,30 a 0,65 apresentam correlação positiva média; entre 0,00 a 0,30 correlação positiva fraca. A correlação torna-se com os coeficientes negativos.

VI. DISCUSSÃO

Na LVC a resposta imune órgão-específica pode variar de acordo com o órgão afetado. Em camundongos a multiplicação do protozoário *Leishmania* sp. no fígado ocorre nos primeiros dias de infecção e após os mesmos são eliminados. Já no baço e medula óssea a infecção progride para a cronicidade. Estas diferenças podem estar relacionadas com a população celular e as vias regulatórias que participam deste processo em cada órgão (ENGWERDA e KAYE, 2000).

No presente estudo, o fígado de cães com LVC apresentou inflamação crônica discreta, com predominância de células de Kupffer. Segundo Hayes (2004), o fluxo de sangue dentro dos sinusóides é lento para favorecer o contato do sangue com os hepatócitos, para absorção dos nutrientes oriundos do intestino. Esta velocidade de fluxo facilita o contato de patógenos com as células de Kupffer para sua remoção via fagocitose. Estudos em cães com LV também descrevem a reatividade destes histiócitos hepáticos (LIMA et al., 2007; GIUNCHETTI et al., 2008; REIS et al., 2009). Possivelmente, as células de Kupffer participam da modulação da resposta hepática ao parasito, juntamente com as células Pit, na secreção de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6) e óxido nítrico, que induziriam a resposta imune e regeneração do tecido hepático, as mesmas possivelmente iniciam a formação dos granulomas na LVC. As citocinas secretadas no fígado seriam as responsáveis pela migração dos demais tipos celulares que compõe o infiltrado inflamatório (HAYES, 2004).

Outros grupos de pesquisa relataram também hepatomegalia, inflamação na cápsula hepática e nos espaços-porta e presença de granulomas intralobulares (XAVIER et al., 2006, LIMA et al., 2007, GIUNCHETTI et al., 2008, MELO et al., 2009; REIS et al., 2009). Estes achados estão de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho.

No fígado dos cães deste estudo, as células predominantes do infiltrado inflamatório foram de linfócitos mesclados aos macrófagos (granulomas), seguidos de plasmócitos, concordando com os achados de Moreira et al. (2010) e Bandarra (2010) nos linfonodos, Moreira et al. (2013) na pele e linfonodos e Penha (2011) no

fígado e baço. Tasca et al. (2009) verificaram a presença de neutrófilos associados ao infiltrado inflamatório esplênico de cães com LV, porém no presente estudo neutrófilos foram raramente observados no infiltrado inflamatório do fígado e baço.

No fígado canino foram descritos granulomas ricos em linfócitos, plasmócitos e células epitelióides, bem como a presença ou não de formas amastigotas (GIUNCHETTI et al., 2008; MELO et al., 2008). E no baço (TAFURI et al., 2001; TASCA et al., 2009) observaram ainda células gigantes nos granulomas. No presente estudo, as células gigantes não foram observadas nos granulomas hepático e esplênico.

No presente estudo, o baço apresentou a maior intensidade de inflamação granulomatosa, que nos cães sintomáticos foi difusa. Os animais apresentaram reatividade linfóide na polpa branca (cães assintomáticos) e inflamação da cápsula e da polpa vermelha, composta por macrófagos (granulomas) e plasmócitos predominantemente (cães sintomáticos). A presença de macrófagos parasitados foi mais intensa no baço quando comparado ao fígado. Reis et al. (2009) e Tasca et al. (2009) também observaram esplenite associada à presença de formas amastigotas do parasito nos macrófagos. A metaplasia mielóide da polpa vermelha do baço foi observada em cães dos grupos infectados (O e S). Em cães com LV é comum o envolvimento da medula óssea, embora existam escassos relatos na literatura científica descrevendo as alterações deste órgão nesta doença (NATAMI et al., 2000; FOGLIA-MANZILO et al., 2006). A medula óssea dos cães deste estudo (grupos O e S) apresentou formas amastigotas de *Leishmania* sp., permitindo sugerir que a causa da metaplasia mielóide observada no baço e raramente no fígado, estava associada a presença de granulomas e parasitos na medula óssea. Nestes casos o baço e em menor proporção o fígado estariam fazendo hematopoiese extramedular.

No presente trabalho, nos casos mais avançados da doença (cães sintomáticos), a atrofia linfóide da polpa branca foi um aspecto importante e em vários casos esteve associada à inflamação granulomatosa da polpa vermelha, com distorção da arquitetura do órgão, o que concorda com os achados de Tasca et al. (2009), os quais observaram uma completa desorganização dos tecidos esplênicos, sem a separação nítida da polpa vermelha e branca, com extensas áreas repletas de

macrófagos intensamente parasitados com amastigotas, células gigantes e de granulomas difusos. Também, Tafuri et al. (2001), observaram ainda na infecção crônica a presença de reação inflamatória crônica e difusa estendendo-se desde a região capsular, subcapsular, trabecular e polpa branca. Smelt et al. (1997), também observaram em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *L. donovani*, que no centro germinativo esplênico havia uma diminuição de linfócitos B e de células dentríticas foliculares, juntamente com uma acentuada infiltração de macrófagos altamente parasitados na polpa vermelha, originando a distorção do órgão esplênico. O mesmo aspecto foi observado nos linfonodos por Moreira et al. (2010 e 2013), que nos casos mais avançados da infecção observaram atrofia linfóide nos linfonodos periféricos de cães com LVC associada ao infiltrado granulomatoso difuso estendendo-se da cortical a medular.

O aspecto morfológico dos granulomas no baço diferiu dos encontrados no fígado, ou seja, neste último os granulomas eram bem delimitados e ricos em linfócitos, ao contrário do que ocorreu no baço. Dois padrões morfológicos de granulomas, foram descritos por Ackermann (2009), um do tipo lepromatoso, o qual apresenta-se difuso, pobremente delimitado, de distribuição sistêmica, com alta densidade de microorganismos associados à lesão, pobre em linfócitos e com predominância de citocinas do tipo Th2. O outro, do tipo tuberculoide, é nodular, geralmente com necrose central, circundada por macrófagos, células epitelióides e gigantes, linfócitos, plasmócitos e tecido fibroso. O perfil predominante de citocinas é Th1 e o número de patógenos associados à lesão é escasso. No presente estudo, nos cães infectados, o granuloma esplênico foi do tipo lepromatoso, rico em parasitos e com bordas pobremente definidas. Mariano (1995) afirma que os macrófagos são os principais componentes da inflamação granulomatosa, pois se diferenciam em células epitelióides e em células gigantes, mas a presença de linfócitos neste tipo de inflamação pode contribuir para a expansão ou para a resolução da lesão. Ainda, Murphy et al. (2008) destacam que nos granulomas do tipo lepromatoso, a presença de linfócitos T está reduzida ou ausente. As observações destes autores podem ser aplicadas para o nosso estudo e, as diferenças no perfil celular dos granulomas poderiam ser associadas a um possível perfil alterado de citocinas nos microambientes hepático e esplênico.

Estudos realizados por Sanchez et al. (2004), em cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* demonstraram diferenças na resposta imunológica observada no baço e fígado. Estes autores relataram que no baço a resposta imune dos cães sintomáticos e assintomáticos foi muito similar. No fígado, entretanto, os cães assintomáticos mostraram uma imunidade efetiva, com granulomas bem formados contendo células T efectoras, ao passo que, os animais sintomáticos apresentavam granulomas desorganizados, compostos por infiltrado de células T e numerosas células de Kupffer parasitadas. Estes autores também observaram menor parasitismo no baço, em relação ao observado no fígado. Esses resultados, no entanto, contrastam com os achados de Tafuri et al. (1996) e Lima et al. (2007) que ao estudarem cães experimentalmente (n= 6) e naturalmente infectados (n=66), observaram granulomas intralobulares bem organizados, no fígado de todos os animais estudados, independente da forma clínica. No presente trabalho, tanto no baço quanto no fígado, a intensidade das lesões foram mais evidentes nos cães do grupo S. Já Melo et al. (2009), observaram um maior número de granulomas nos cães assintomáticos (n=10). Esse achado também foi descrito em modelos murinos da leishmaniose visceral infectados experimentalmente com *Leishmania donovani* (MURRAY et al., 2001).

Lima et al. (2007) observaram, por meio de análise histomorfométrica, que os cães assintomáticos tiveram maior número de granulomas hepáticos do que os sintomáticos, mostrando que o parasitismo diminuía quando aumentava o diâmetro dos granulomas. Da mesma forma, Melo et al. (2009) verificaram maior número de granulomas em animais assintomáticos, sugerindo estar diretamente relacionado à menor carga parasitária hepática. No presente estudo, dos 71 cães infectados, alguns cães assintomáticos (8/17) e oligossintomáticos (5/23) não apresentaram inflamação granulomatosa hepática. Destes animais, dois do grupo A e apenas um do grupo O não tiveram parasitos imunomarcados nestes granulomas. Portanto, cerca de 15 cães (A=7; O=8) não tiveram parasitos, mas apresentaram inflamação granulomatosa. No grupo A apenas um animal teve ausência de imunomarcção simultaneamente em fígado e baço, já no O apenas quatro cães não apresentaram imunomarcção simultânea no baço. Por este fato sugere-se que no grupo assintomático cerca de 47,05% dos cães foram capazes controlar a multiplicação do

parasito, possivelmente por meio de uma imunidade mediada por células. Já no grupo oligossintomático essa proporção caiu para 21,8%. Outros estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Neste estudo, o fígado não diferiu entre os grupos na proporção de linfócitos macrófagos e plasmócitos no infiltrado inflamatório. Possivelmente a maior participação dos linfócitos na resposta imune hepática possa estar relacionada ao padrão diferenciado dos granulomas hepáticos e à baixa carga parasitária neste órgão. Justifica-se esta hipótese pela correlação significativa observada entre macrófagos e linfócitos no fígado de cães assintomáticos. Quando aumenta o número de macrófagos também aumenta o de linfócitos. Parece haver uma interação entre estas células. Em estudos futuros, seria interessante comparar as diferenças na função dos macrófagos entre estes dois órgãos. Sanchez et al., (2004) observaram uma resposta inflamatória distinta entre cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados com *L. chagasi*. O fígado de animais assintomáticos apresentou uma resposta imune inflamatória efetiva, com formação de granulomas bem organizados. Nos cães sintomáticos ocorreu à formação de granulomas desorganizados compostos preferencialmente por células de Kupffer altamente parasitadas. Estes autores sugerem uma reação imune órgão-específica na LVC. No baço dos animais infectados, em geral, a resposta imune inflamatória não era definida, com manutenção do parasitismo. Engwerda e Kaye (2000) apresentam um modelo experimental murino infectado com *L. donovani* e *L. infantum*, onde verificaram a especificidade da resposta imunológica em diferentes órgãos. O fígado apresentaria resposta imune do tipo Th1, caracterizada por aumento da atividade de células T e concomitante resposta inflamatória eficaz para o controle e resolução da doença visceral. Já no baço verificaram cronicidade do parasitismo.

Murray et al. (2001) discutiram o papel efetor de monócitos e macrófagos como células fundamentais na defesa efetiva do hospedeiro na LV experimental. Por outro lado, Lima et al. (2007) observaram nos animais sintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, uma expressão aumentada de integrinas de adesão CD11b e CD18 (CR3) nos macrófagos do baço, juntamente com o elevado parasitismo tecidual deste órgão, sugerindo-se que os macrófagos

seriam mais uma fonte de perpetuação da infecção causada por *L. chagasi*. No presente estudo, os macrófagos parasitados não mostraram imunomarcção para o anticorpo MAC387 e nem para MHC-II, sugerindo uma função alterada destas células conforme sugerido por Lima et al. (2007).

No fígado, a carga parasitária foi maior nos cães do grupo S, mas com uma densidade de parasitos inferior a do baço, porém não houve diferença significativa entre os órgãos. A associação da carga parasitária foi positiva no grupo S, sugerindo que quando aumenta o número de parasitos em um órgão, concomitantemente aumenta no outro. Reis et al. (2009) revelaram padrões distintos de densidade parasitária nos tecidos de cães infectados por *L. chagasi* e apontaram a pele e o baço como os locais que apresentaram parasitismo elevado, durante o curso da doença. Lima et al. (2007) observaram no baço diferenças significativas entre os cães sintomáticos (n=44) e assintomáticos (n=22), sendo que os primeiros tiveram maior parasitismo. No fígado a carga parasitária foi maior em cães sintomáticos, embora não houvesse diferença estatística entre os grupos de cães infectados. Ainda, Sanchez et al. (2004) estudando 41 cães do grupo A e 19 do S, Giunchetti et al. (2008) com 17 cães S, 12 O e 12 A e, Melo et al. (2009) com 10 cães S e 10 A, descreveram uma elevada carga parasitária hepática no grupo sintomático, com diferença significativa entre os demais grupos de cães. No presente estudo, a maior carga parasitária foi observada nos cães sintomáticos, no entanto não houve diferença estatística significativa entre os grupos de cães infectados.

Alguns estudos destacam maior parasitismo em tecidos de animais assintomáticos que em animais sintomáticos (XAVIER et al., 2006; GIUNCHETTI et al. 2008). Estes dados enfatizam a importância dos cães assintomáticos no ciclo epidemiológico da LVC. No presente estudo a densidade de células imunomarcadas para o parasito, no fígado e baço de cães do grupo A, foi discreta e diferiu destes autores. A diferença encontrada na densidade de carga parasitária entre o fígado e baço, está de acordo com os resultados de Penha (2011), que em seu estudo demonstrou, por meio de técnica de qPCR, que o baço é um sítio mais susceptível ao parasito, resultando em maior densidade parasitária neste órgão quando comparado ao fígado.

Em outros estudos feitos nos linfonodos poplíteos (MOREIRA et al., 2010); subescapular, mesentérico, ilíaco (MOREIRA et al., 2013) e no baço (dados não publicados), a carga parasitária foi elevada e associada à intensidade acentuada de inflamação granulomatosa, sempre observada nos cães do grupo sintomático. Neste estudo, possivelmente o fígado seria mais resistente à proliferação do parasito, quando comparado a outros órgãos. Também, Reis et al. (2009) destacou estas respostas diferentes em seu estudo em cães com leishmaniose visceral e denominou este aspecto de resposta compartimentalizada ao parasito, ou seja, existem órgãos mais resistentes e outros mais susceptíveis à multiplicação do protozoário *Leishmania*.

A apoptose foi uma lesão que mostrou diferenças entre os compartimentos hepático e esplênico. A presença de apoptose nos cães com LVC foi mais evidente e significativa no fígado de cães do grupo O e no baço de cães do grupo S, com envolvimento predominante de linfócitos do infiltrado inflamatório. Entretanto, o baço foi o órgão que apresentou mais células em apoptose, pois teve uma média de 8,12 células apoptóticas nos grupos de cães infectados, que foi quase quatro vezes superior ao grupo controle (2,44). Já no fígado, a média de apoptose foi 1,95 no grupo infectado para 0,46 células apoptóticas nos cães controle. Estes resultados coincidem com os de Moreira et al. (2013) que estudaram a apoptose nos linfonodos e na pele e verificaram que a taxa de células em apoptose foi mais elevada em órgãos com maior carga parasitária. Da mesma forma, no presente estudo, a importância dos linfócitos no fígado foi sugerida pela correlação positiva entre estes e a apoptose. Para comprovar se os linfócitos estariam atuando no controle do parasitismo hepático seria importante avaliar futuramente o fenótipo desta população celular. A identificação de uma população predominante de linfócitos CD4 ou CD8 seria imprescindível para a diferenciação do padrão de resposta hepática ou esplênica.

Neste estudo, a predominância das imunomarcações para apoptose ocorreu na polpa vermelha esplênica e principalmente na transição entre esta e a polpa branca. Moreira et al. (2013) observaram apoptose de linfócitos nas regiões paracortical dos linfonodos de cães com LVC, região esta povoada pelos linfócitos T.

No presente estudo, sugere-se que a evasão imune do parasito poderia estar relacionada com a correlação positiva observada entre a carga parasitária e a apoptose no baço de cães oligossintomáticos. A apoptose seria uma das vias de escape imunológico do parasito, tornando estes cães menos eficientes em responder à infecção, pela redução da população linfóide, similar ao que foi descrito por Moreira et al. (2013) em linfonodos. Freire-de-Lima et al. (2000) observaram a apoptose de linfócitos T em camundongos infectados com *T. cruzi*, sugerindo que este processo foi importante para a sobrevivência do protozoário dentro de macrófagos e possivelmente levou a uma inibição da resposta Th1. Outros autores observaram que a liberação de moléculas pró-apoptóticas pelo protozoário, no meio extracelular, induziria a apoptose de macrófagos e a liberação de formas infectivas viáveis de *T. cruzi* (LOPES e DOS REIS, 2000).

Na comparação entre os grupos de cães infectados, não foram observadas diferenças significativas tanto para carga parasitária quanto para apoptose. Somente no baço, os grupos S e C diferiram para apoptose ($P=0,0303$), bem como, no fígado os grupos O e C ($P=0,0365$). Moreira et al. (2010 e 2013) observaram que em relação a estes parâmetros, os linfonodos periféricos poplíteo e subescapular somente diferiram nos grupos S e O do grupo controle para apoptose. Para carga parasitária estes grupos apresentaram maior densidade de parasitos que o grupo A. Uma hipótese para explicar a ocorrência de apoptose de linfócitos T em cães com LVC seria a ausência de sinais coestimulatórios, que inibiriam a proliferação e diferenciação das células T efectoras. Este mecanismo é dependente da produção de citocinas, em especial IL-2, levando o linfócito a um processo de anergia ou morte celular (MURPHY et al., 2008).

Goto e Lindoso (2004) observaram a apoptose em hamsters na leishmaniose visceral experimental com *Leishmania chagasi* apenas na fase inicial da infecção, no fígado e baço. Porém, Moreira et al. (2013) observaram nos linfonodos que a apoptose estava aumentada em cães sintomáticos, envolvendo linfócitos T e resultando em atrofia linfóide. No presente estudo, a apoptose, assim como descrito por Moreira et al. (2013), ocorreu na fase crônica da infecção (cães com doença avançada), diferindo dos relatos feitos na infecção experimental em hamster (GOTO e LINDOSO, 2004) e mostrando que possivelmente este hospedeiro experimental

não sofre os efeitos imunomodulatórios da saliva do inseto vetor do protozoário, como ocorre com os cães naturalmente infectados.

Além da apoptose, outros mecanismos de evasão ou de imunomodulação poderiam ser utilizados pelo parasito *Leishmania* sp. para garantir a sua sobrevivência nos diferentes compartimentos do hospedeiro. Assim, avaliou-se o papel das células Pit ou natural killer hepáticas no fígado e comparou-se a densidade destas células com a das células NK no baço. No fígado, a densidade de células NK foi maior no grupo S (média=2,03), porém não houve diferença entre os grupos de cães infectados (A média=0,97 e O média=1,10) e o grupo controle (média=0,94). Já no baço as diferenças ocorreram entre os grupos O e A e O e C. Os grupos A (média=9,15) e C (média=15,9) tiveram número maior de células NK em relação aos grupos S (média=5,12) e O (médias=4,13). Neste caso verificou-se que tanto no fígado quanto no baço, a detecção de células NK foi muito baixa. No baço, a mesma foi menor ainda nos cães com doença avançada que tiveram valores inferiores ao grupo controle. Portanto, parece não haver uma participação efetiva destas células nos cães sintomáticos, possivelmente pelo desequilíbrio no perfil de citocinas Th1 e Th2 que já foi descrito em cães com LV (BARBIÉRE, 2006; CORREA et al., 2007; ALVES et al., 2009), que poderia influenciar na ativação das células NK.

No presente estudo sugere-se que a composição mista dos granulomas hepáticos, ricos em linfócitos estaria contribuindo para a resistência hepática e consequente carga parasitária baixa. Já a susceptibilidade do baço estaria relacionada à presença discreta das células NK, a apoptose de linfócitos e aos granulomas pobres em linfócitos, favorecendo, portanto, a sobrevivência do parasito neste órgão. Na infecção experimental com *L. donovani* em camundongos, foi observado que a ineficiente resolução da infecção esplênica parece envolver uma falha de linfócitos T e células NK em ativar os macrófagos na zona marginal de forma eficiente. Isto poderia resultar em uma falha destas células em produzir quimiocinas que estimulem a migração leucocitária (INF- γ , TNF- α , IL2 e IL12) ou falha de macrófagos infectados em ativar mecanismos intrínsecos, por meio da neutralização de IL-12. Em contraste, a capacidade do fígado em resolver a infecção é dependente da formação de focos inflamatórios em torno das células de Kupffer

infectadas, constituídos por linfócitos e monócitos, os quais permitem a fusão de células infectadas e a destruição de amastigotas por macrófagos ativados no infiltrado (ENGWERDA e KAYE, 2000).

Outro aspecto deste estudo foi a correlação negativa observada entre a carga parasitária e as células NK no fígado de cães assintomáticos. Quando aumentava o número de parasitos hepáticos diminuía a densidade de células NK, mostrando uma interferência na ativação destas células, possivelmente por um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2. No baço de cães do grupo A e O, houve correlação positiva entre as células NK e TNF- α . Possivelmente, outros mecanismos de evasão estejam interferindo na ação citotóxica destas células sobre macrófagos parasitados no baço. Scott e Trinchieri (1995); Engwerda e Kaye (2000) relatam que muitas das funções fisiológicas das células NK são mediadas, em parte, pela sua capacidade de secretar citocinas. Elas ativam IFN- γ e secretam TNF- α , destruindo eficientemente o parasita.

Sabe-se que as células NK desempenham múltiplos papéis nas interações parasita-hospedeiro, mas a sua função efetora não se limita à sua capacidade lítica. Em muitos casos, a produção de citocinas pode ser a sua contribuição para a resistência primária, pois as células NK, através das citocinas que as ativam, como o IFN- γ , TNF- α e IL-12, podem também influenciar o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Os mecanismos de reconhecimento das células alvo pelas células NK ainda não foi caracterizado, devido a identificação incompleta de seus receptores celulares, e também pelo fato de que cada célula NK provavelmente expressa vários receptores diferentes. Alguns são capazes de traduzir sinais positivos resultantes de citotoxicidade e a secreção de citocinas e outros prevalentemente ativar sinais inibitórios (SCOTT e TRINCHIERI, 1995). As células NK possuem receptores de lectina (KLRs) e receptores de imunoglobulinas (KIRs). A mesma família estrutural de receptores NK contém ambos os receptores inibitórios e os de ativação destas células. Os inibitórios atuam na proteção da destruição de células saudáveis pelas NK (MURPHY et al., 2008). Em estudos futuros seria interessante avaliar a expressão dos diferentes receptores de células NK em cães com LVC, pois talvez apenas os receptores inibitórios estejam ativados, impedindo a ação citotóxica destas células.

A citotoxicidade e a expressão dos antígenos CD16 e CD56 são características adquiridas pelas células NK, no seu último estágio de diferenciação. Enquanto o antígeno CD16 nem sempre está presente nas células NK diferenciadas, o antígeno CD56 constitui um marcador imunológico importante destas células (ESTEVINHO, 2004).

Duarte et al. (2008), por meio da técnica de imuno-histoquímica, avaliaram em nove pacientes humanos oligossintomáticos a expressão reduzida de IL-4 e IL-10 e que os níveis de TNF- α e INF- γ estavam moderadamente aumentados. O número de células NK hepáticas estava aumentado, caracterizando resistência deste órgão para *Leishmania*, por causar a lise direta e indireta dos parasitos. Além disso, estas células podem direcionar a resposta Th1, permitindo a ativação de macrófagos e melhorando a eliminação do parasita. No presente estudo, a imunodeteção de células NK foi baixo tanto no fígado quanto no baço canino, diferindo dos relatos deste autor.

No presente estudo, a presença de macrófagos foi mais evidente no grupo S e no baço. Estes resultados podem estar associados à maior intensidade de inflamação granulomatosa neste órgão, aliada à maior carga parasitária. Este aspecto coincide com os relatos de Moreira et al. (2010) e Moreira et al. (2013), que também observaram lesões similares em linfonodos de cães com doença avançada. Alguns autores afirmam que, no fígado, a presença de granulomas associados à baixa carga parasitária indicaria um sinal de resistência deste órgão frente à infecção (GIUNCHETTI et al., 2008).

Neste estudo, a correlação positiva entre macrófagos e as células NK no fígado mostra uma possível ativação destes últimos. As células NK são ativadas em resposta a IFN- α e β e macrófagos ativados. As células NK quando ativadas podem secretar grandes quantidades de IFN- γ , que na sequência podem influenciar na resposta dos linfócitos T CD4+ contra patógenos (Th1), altamente eficientes em ativar macrófagos, levando à resolução da injúria (MURPHY et al., 2008). Apesar da baixa densidade de células NK parece que estas juntamente com os macrófagos estariam favorecendo a resistência hepática à multiplicação do parasito, bem como, poderiam estar participando da ativação de linfócitos T. O anticorpo utilizado no presente estudo para imunomarcas macrófagos foi o MAC387, que tem afinidade em

ligar-se a calprotectina, que é uma proteína presente em macrófagos jovens. A mesma é utilizada como marcador de doenças inflamatórias e participa de processos como a tumorigênese, a apoptose e a homeostase celular, além de respostas mediadas por células Th1 em reações imunes e imunopatológicas (STRÍZ e TREBICHAŤSKÝ, 2004; DHAS et al., 2012). Em um estudo em placas de Peyer de humanos, destacou-se a detecção desta proteína em macrófagos e granulócitos. A calprotectina (L1) mostrou atividades antimicrobianas in vitro e supostas propriedades antiproliferativas, pois notaram função imunoestimuladora sobre macrófagos, realizando uma indução na imunidade (BJERKE et al., 1993). No presente estudo, a marcação de macrófagos com o MAC387 não ocorreu em macrófagos parasitados, sugerindo que estas células não estariam expressando a calprotectina em sua membrana celular e considerando os estudos acima, possivelmente teriam sua capacidade de estimulação da resposta imune reduzida.

Leishmania sp. pode influenciar na resposta do hospedeiro pela inibição da apresentação de antígenos e da estimulação de células T, entre outros (HALLORAN et al., 1986). Portanto, avaliar o papel do MHC-II no fígado e baço poderia auxiliar no entendimento do padrão diferenciado de resposta imune. Neste estudo, observou-se a imunodetecção de MHC-II em macrófagos e linfócitos dos granulomas e em células de Kupffer, predominantemente. Um aspecto interessante foi verificar a marcação positiva de formas amastigotas intracitoplasmáticas em macrófagos, sugerindo mimetismo imunológico do parasita.

No fígado houve diferença significativa na imunodetecção de MHC-II no grupo de cães sintomáticos em relação aos demais. O mesmo ocorreu no baço, mas também os cães oligossintomáticos diferiram dos cães controle. Tanto no fígado como no baço a expressão de moléculas de MHC-II foi maior nos casos mais avançados da doença. Alguns estudos têm mostrado que *L. donovani* inibe a apresentação de antígenos, por meio da inibição da expressão de genes de MHC classe II (REINER et al., 1987). Por outro lado, macrófagos infectados com *L. amazonensis* expressaram níveis normais de MHC classe II (LANG et al., 1994), mostrando um comportamento diferenciado entre as diferentes espécies de *Leishmania*. A inibição da capacidade de expressar moléculas de MHC classe II na membrana celular de fagócitos ou a expressão internalizada na membrana celular da

forma amastigota foram descritos para *Leishmania amazonensis* (LEÃO et al., 1995). A expressão alterada de MHC-II poderia comprometer tanto a lise do parasito no interior do macrófago quanto a capacidade de apresentá-lo aos linfócitos T CD4+. Portanto neste estudo, sugere-se que os a expressão de MHC-II elevada principalmente em cães sintomáticos, diferente do descrito em outras pesquisas, poderia ser um mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro canino, que expressaria uma molécula de MHC alterada e que não seria reconhecida pelos receptores de linfócitos, tornando ineficiente a capacidade de apresentação de antígenos e enganando o sistema imune do hospedeiro. No sistema imune, a interação celular se dá pela ligação específica entre carboidratos e lectinas. Ambos são amplamente distribuídos nos tecidos dos mamíferos, mas os carboidratos são capazes de variar grandemente quando comparados a proteínas ou ácidos nucleicos. Esta interação entre ambos pode estar relacionada a vários mecanismos, tais como, a opsonização, fagocitose, adesão e migração celulares, ativação e diferenciação e a apoptose (NI e TIZARD, 1996). Por este fato, seria fundamental entender as variações desta interação, de acordo com o estado de ativação da célula, para permitir que no futuro possam ser delineados novos métodos terapêuticos ou preventivos de doenças. Recentemente uma nova área foi criada, baseada nesta interação entre as lectinas e os carboidratos, denominada glicopatologia.

Na literatura sobre LVC destaca-se o desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 em cães (BARBIÉRI, 2006). Muitos autores descrevem uma predominância de citocinas de perfil Th2 em animais susceptíveis ao parasito *Leishmania* sp. (CORREA et al., 2007; ALVES et al., 2009). Por este fato, a análise da produção de citocinas pró (TNF- α) e antiinflamatórias (TGF- β) no baço e fígado poderia mostrar a susceptibilidade ou resistência de cada órgão infectado por *Leishmania*. No presente estudo, o fígado de cães sintomáticos diferiu dos grupos A e C para imunodeteção de TGF- β . Já no baço, no mesmo grupo, esta diferença ocorreu entre os demais grupos. A expressão desta citocina foi maior no baço ($P < 0,0001$), o que concorda com Correa et al. (2007), que verificaram predominância de TGF- β e IL-10 em baços de cães com LV. A predominância destas citocinas influencia na produção de IFN- γ , que em concentração insuficiente não ativa os macrófagos no sítio de injúria

(STANLEY e ENGWERDA, 2007). Um microambiente Th2 é favorável ao parasito (BARBIÉRI, 2006). Na infecção experimental em camundongos infectados com *L. major* na leishmaniose cutânea, Kane e Mosser (2001) observaram um mecanismo pelo qual a *Leishmania* induz a produção de IL-10 a partir de macrófagos, impedindo a ativação de outros macrófagos e diminuindo a produção de IL-12 e TNF- α . IL-10 foi importante na prevenção da morte de parasitas pelos macrófagos e possivelmente tornou os mesmos refratários aos efeitos ativadores de IFN- γ .

A imunodeteção de TNF- α foi baixa em todos os cães infectados, entretanto o grupo A foi o que apresentou maior número de células imunomarcadas. Tendo sido o baço o órgão com maior número de células positivas. Quando comparamos a expressão desta citocina com TGF- β , observa-se que TNF teve uma produção muito baixa nos cães infectados, o que poderia explicar o desequilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 descrito por Barbiéri (2006). Murphy et al. (2008) destacam o papel de TGF- β no bloqueio da produção de citocinas, da divisão celular e da capacidade microbicida de fagócitos. Simultaneamente, esta citocina de perfil Th2, juntamente com IL-10, aumenta a sobrevivência de linfócitos B, a maturação de plasmócitos e a atividade de linfócitos T CD8+. No presente estudo seria interessante diferenciar a população de linfócitos T no fígado e baço, pois parte da resistência hepática poderia ser influenciada por linfócitos T CD8+, além das células NK. O infiltrado plasmocitário observado nos animais com LVC também poderia ser influenciado por esta citocina, o qual resulta nos quadros de hipergamaglobulinemia e formação de imunocomplexos descritos nos animais infectados por *Leishmania* sp.

Cães sintomáticos apresentam alterações no perfil imunológico envolvendo linfócitos T, com ausência de hipersensibilidade do tipo tardia, diminuição de células mononucleares no sangue periférico e ausência da produção de INF- γ , TNF- α e IL-12 pelas células mononucleares do sangue periférico (LUNA et al., 1999; SANTOS-GOMES et al., 2002; BARBIÉRI, 2006). A ativação de macrófagos por citocinas derivadas de linfócitos T CD4+ (Th1) leva a resistência à infecção, pela produção de INF- γ , TNF- α e IL-12 (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995) ou a susceptibilidade quando predominam citocinas Th2. Neste caso, ocorre a sobrevivência do parasito e a exacerbação das lesões, em razão das ações supressivas das citocinas TGF- β , IL-10 e IL-4, sobre os macrófagos (BARBIÉRI,

2006; CORRÊA et al., 2007; ALVES et al., 2009). No presente estudo, tanto no fígado como no baço imunodeteção da citocina TNF- α foi muito baixa. Outra metodologia, com maior sensibilidade seria mais adequada para mostrar os níveis de TNF- α e TGF- β nos compartimentos hepático e esplênico, tal como as técnicas de qPCR ou ELISA. Michelin et al. (2011) avaliaram a presença de TNF- α , IL-4 e IL-10 em amostras de baço e de fígado em 40 cães adultos naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* e 12 cães controles. Os níveis de citocinas foram avaliados por ELISA de captura e a quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real. TNF- α desempenhou um papel importante no processo patológico da leishmaniose visceral, especialmente no fígado de cães sintomáticos. Notaram ainda uma associação entre os níveis de TNF- α e um aumento na carga parasitária neste grupo, indicando ser importante no processo da evolução da infecção. Além disso, observaram também um aumento dos níveis de TNF- α , IL-4 e IL-10 no fígado de cães infectados, em comparação com cães saudáveis, e ao comparar os órgãos o fígado foi o que apresentou os níveis mais elevados destas citocinas.

Um aspecto interessante foi observar a correlação positiva entre linfócitos e TGF- β no fígado de cães sintomáticos. Murphy et al. (2008) descrevem que uma população de linfócitos T regulatórios, que expressam FoxP3 sob influência de TGF- β , fazem com que estas células produzam mais TGF- β , e desta forma exerçam um efeito supressivo sobre a resposta imune. Outros estudos seriam necessários para avaliarmos a possível influência das células Treg na modulação da resposta imune para um perfil Th2 em cães com LVC.

O entendimento da modulação da resposta imune em cães com LV é bem complexo, pois além dos fatores genéticos e da variabilidade individual de cada animal, existe um total desequilíbrio entre fatores promotores e reguladores do processo inflamatório. Provavelmente, pesquisas que utilizam técnicas moleculares avançadas para identificar genes superexpressos ou inibidos na LVC, poderiam esclarecer as diferenças entre os grupos de cães sem ou com sinais clínicos desta zoonose. Outro aspecto que deve ser ressaltado é a influência do tempo de infecção na resposta imune dos cães, pois neste estudo utilizou-se animais com infecção natural e não foi possível determinar o tempo exato de evolução da doença.

VII. CONCLUSÕES

- O baço foi mais susceptível à infecção por *L. chagasi*, pois mostrou a maior taxa de apoptose e maior intensidade de lesões que o fígado, resultando em maior carga parasitária nos cães com doença avançada (grupo S);
- A resistência hepática foi observada pelo perfil celular dos granulomas ricos em linfócitos, à participação das células NK e à atividade das células de Kupffer no controle do parasito, resultando em uma menor carga parasitária;
- As células NK no baço não tiveram papel citotóxico aparente sobre macrófagos parasitados, pois este apresentou a maior carga parasitária;
- A expressão de MHC-II foi maior no baço de cães sintomáticos, porém a apresentação antigênica parece ser pouco eficiente, devido ao elevado número de parasitos neste órgão;
- As citocinas TGF- β e TNF- α apresentaram uma reduzida imunomarcagem no baço e no fígado.

VIII. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M.R. Inflamação crônica e cicatrização de feridas. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 2009. cap.4, p. 153-191.

ALVES, W.A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v.6, n.71, 2009, p.25-29.

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

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.218, n.5, p.669-696, 2001.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Porto, v.30, p.1269-1281, 2000.

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

BANDARRA, M.B. **Análise da composição celular e imunodeteção de MIF em linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral**. 2010. 45f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Jaboticabal, 2010.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania* mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, Elmsford, n.28, p.121-134, 1998.

BRASIL - Ministério da Saúde. Secretária de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120p.

BRITO, F.L.C. **Patologia, resposta imune humoral e diagnóstico em cães com oftalmopatias decorrentes da infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2006. 55f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; KATZ, G.; RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGE, L.C.; SPÍNOLA, R.M.F.; CRUZ, O.G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, n.5, p.1263-1267, 2001.

CASTRO, A.G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral: normas técnicas**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86p.

CORRÊA, A.P.F.L.; DOSSI, A.C.S.; VASCONCELOS, R.O.; MUNARI, D.P.; LIMA, V.M.F. Evaluation of transformation growth factor- β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.143, p.267-274, 2007.

COTTER, T.G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nature Reviews-Cancer**, v.9, p.501-507, 2009.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, Amsterdam n. 72, p. 132-141, 2002.

DOS REIS, G.A.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; GUILLERMO, L.V.C.; LOPES, M.F. Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. **Cytokine e Growth Factor Reviews**, Kidlington, v.18, p.97-105, 2007.

DUARTE, M.I.S. **Análise subcelular qualitativa e morfométrica dos hepatócitos e da região sinusoidal na leishmaniose visceral humana**. 1987. 235p. Livre Docência - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. São Paulo, 1987.

DUARTE, M.I.S.; TUON, F.F.; PAGLIARI, C.; KAUFFMAN, M.R.; BRASIL, A.R. Human visceral leishmaniasis expresses Th1 pattern in situ liver lesions. **The Journal of Infection**, v.57, n.4, p.332-337, 2008.

DUARTE, M.I.S.; ANDRADE JR., H.F.; TAKAMURA, C.F.H.; SESSO, A.; TUON, F.F. TGF-beta and mesenchymal hepatic involvement after visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, v.104, p.1129-1136, 2009.

ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. **Viewpoint Immunology Today**. v.21, n.2, p.73-78, 2000.

ESTEVINHO, A.P.R. **Estudo do gene CD56 em doentes com Leucemia Crônica de Células Natural Killer CD56 negativas**. 2004. 89f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil. Thomas Jefferson Medical College. Porto, 2004.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: VERONESI - **Tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. v.1, p.1543-1557.

FOGLIA-MANZILLO, V.; RESTUCCI, B.; PAGANO, A.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **Veterinary Record**, v.158, n.20, p.690-694, 2006.

FREIRE-DE-LIMA, C.G.F.; NASCIMENTO, D.O.; SOARES, M.B.P.; BOZZA P.T.; FARIA-NETO, H.C.C.; MELLO, F.G.; DOS REIS, G.A.; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Letters to Nature**, v.403, n.13, p.199-203, 2000.

GAO, B.; RADAEVA, S.; PARK, O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. **J Leukoc Biol**. v.86, n.3, p.513-528, 2009.

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

GIUNCHETTI, R. C., MARTINS-FILHO, O. A., CARNEIRO, C. M., MAYRINK, W., MARQUES, M. J., TAFURI, W. L., CORREIA-OLIVEIRA, R., REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis, **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v.121, p.23-33, 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.37, p.615-623, 2004.

GRIMALDI, J.G.; TESH, R.B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Nothkrook, v.41, p.687-725, 1989.

HALLORAN, P.F.; WADGYMAR, A.; AUTENRIED, P. The regulation of expression of major histocompatibility complex products. **Transplantation**, v. 41, n. 4, p. 413-420, 1986.

HAYES, M.A. Pathophysiology of the liver. In: DUNLOP, R.H., MALBERT, C.H. **Veterinary Pathophysiology**. Blackwell Publishing: Iowa, cap. 11, p. 371-399, 2004.

KORBEL, D.S.; FINNEYB, O.C.; RILEYA, E.M. Invited review: Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.1517-1528, 2004.

LANG, T.; CHASTELLIER, C.; FREHEL, C.; HELLIO, R.; METEZEAU, P.; LEÃO, S.S.; ANTOINE, J.C. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in 40 macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Cell Science**, Washington, v.107, p.69-82, 1994.

LEÃO, S. S.; LANG, F.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTOINE, J.C. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**, Washington, n.108, p. 3219-3231, 1995.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 92, p. 43-53, 2004.

LIMA, W.G.; OLIVEIRA, P.S.; CALIARI, M.V.; GONÇALVES, R.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.117, p.129-136, 2007.

LOPES, M.F.; DOS REIS, G.A. Experimental Chagas disease: Phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. **Apoptosis Journal**, v. 5, n.3, p.221-224, 2000.

LUNA, R.; VUOTTO, M.L.; IELPO, M.T.L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; MANCINO, D. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.70, p. 95-103, 1999.

LUO, D.Z.; VERMIJLEN, D.; AHISHALI, B.; TRIANTIS, V.; PLAKOUTSI, G.; BRAET, F.; VANDERKERKEN, K.; WISSE, E. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 6, n.1, p.1-11, 2000.

MARIANO, M. The Experimental Granuloma: a hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.37, n.2, p.161-176, 1995.

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

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

MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** CD-ROM.

MELO, F.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.; ANDRADE, M.; MICHALICK, M.; RASO, P.; TAFURI, W.; TAFURI, W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Nothkrook, v.79, n.2, p.198-204, Aug, 2008.

MELO, F.A.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; CALIARI, M.V.; TAFURI, W.L.; CALABRESE, K.S.; TAFURI, W.L. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Int. J. Exp. Path**, v.90, p.538-548, 2009.

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; LINS, G.L.; COELHO, M.; ROCHA, M.F.; DIAS, C.L.F.; DIAS, E.S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Salvador, v.38, n.2, p.147-152, 2005.

MOREIRA, P.R.R.; VIEIRA, L.M.; ANDRADE, M.M.C.; BANDARRA, M.B.; MACHADO, G.F.; MUNARI, D.P.; VASCONCELOS, R.O. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitol Res.** v.107, p.605-613, 2010.

MOREIRA, P.R.R.; BANDARRA, M.B.; MAGALHÃES, G.M.; MUNARI, D.P.; PRANDINI, M.M.; ALESSI, A.C.; VASCONCELOS, R.O. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 149-157, 2013.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's Immunobiology**, 7 ed. New York : Garland Science, 2008, p.887.

MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int J. Exp. Path.** v.82, p.249-267, 2001.

MYLONAKIS, M. E., PAPAIOANNOU, N., SARIDOMICHELAKIS, M. N., KOUTINAS, A. F., BILLINIS C., KONTOS, V. I. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n. 3, p.243-247, 2005.

NAVEDA, L.A.B.; MOREIRA, E.C.; MACHADO, J.G.; MORAES, J.R.C.; MARCELINO, A.P. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, 2003. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.6, p.988-993, 2006.

NATAMI, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; BOUDOUMA, M.; GUESSOUSS-IDRRISSI, N.; RHALEM A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. **Veterinary Research**, v.31, n.3, p.355-363, 2000.

NI, Y.; TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.55, n.1-3, p.205-223, 1996.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infection Diseases**, Chicago, v.22, n.1, p.1-11, 1996.

PENHA, T.A. Expressão das quimiocinas MIP-1 α e MCP-1 em relação à carga parasitária em cães com Leishmaniose Visceral. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

PESSÔA, B.S.; MARTINS, A.V. **Parasitologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.66-124.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, Stockholm, v.25, n.6, p.1594–1600, Jun, 1995.

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, v.62, n.1, p.229-335, 1994.

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

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

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.15, n.112(3-4), p.102-16, 2006.

REY, L. Principais grupos de protozoários e metazoários, parasitos do homem e seus vetores. In: _____. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.9, p.123-134.

SANCHEZ, M.A.; DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F.J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v.70, n.6, p.618-624, 2004.

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

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

SAVANI, E.S.M.M.; SCHIMONSKY, B.V.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'AURIA, S.R.N. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.37, n.2, p.260-262, 2003.

SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. **Current Opinion in Immunology**. v.7, p.34-40, 1995.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, n.5, p.577-579, 2006.

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

SOARES, M.J.V. **Seqüenciamento de DNA e imunoistoquímica renal para detecção de *Leishmania sp* em cães**. 2007. 67f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SMELT, S.C.; ENGWERDA, C.R.; McCROSSEN, M.; KAYE, P.M. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**. v.158, p.3813-3821, 1997.

STALKER, M.J., HAYES, M.A. Liver and biliary system. In: MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5 ed., vol. 2, cap. 2, p. 297-388, 2007.

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v.85, p.138-147, 2007.

TASCA, K.I.; BUZETTI, W.A.S.; TENORIO M.S.; PAULAN S.C.; LIMA, F.L.; QUEIROZ, N.M.G.P.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; NEVES, M.F.; NORONHA JR., A.C.F.; ASSIS, J. Parasitological, immunohistochemical and histopathological study for *Leishmania chagasi* detection in splenic tissues of dogs with visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.1, p.27-33, 2009.

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

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.3, p.203–212, 2001.

TAFURI, W. L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, .J.A. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.38, p.81-89, 1996.

WHO - Research to support the elimination of visceral leishmaniasis. Disponível em:<<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/about-tdr/annual-reports/visceral-leishmaniasis-elimination-2008>>. Acesso em: 11/jan./2010.

XAVIER, S.C.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L. Leishmaniose visceral canina: um caso inusitado de um animal assintomático proveniente de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.6, p.994-1000, 2006.

ZORZETTO, R. Uma doença anunciada – Infecção letal causada por parasita de uma só célula, a leishmaniose visceral avança sobre as cidades brasileiras. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n.151, p.46-51, 2008.