

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

LESÕES GENITAIS EM CADELAS NATURALMENTE
INFECTADAS COM *Leishmania infantum*

Paulo Henrique Leal Bertolo

Médico Veterinário

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**LESÕES GENITAIS EM CADELAS NATURALMENTE
INFECTADAS COM *Leishmania infantum***

Discente: Paulo Henrique Leal Bertolo

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Coorientadora: Profa. Dra. Pamela Rodrigues Reina Moreira

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, área de Patologia Animal.**

2020

B546l	Bertolo, Paulo Henrique Leal Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com <i>Leishmania infantum</i> / Paulo Henrique Leal Bertolo. -- Jaboticabal, 2020 80 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos Coorientadora: Pamela Rodrigues Reina Moreira 1. Leishmaniose visceral. 2. Glândula mamária. 3. Sistema genital. 4. Resposta imune. 5. Influência hormonal. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

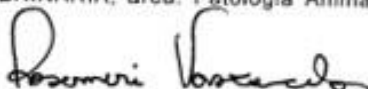
TÍTULO DA TESE: LESÕES GENITAIS EM CADELAS NATURALMENTE INFECTADAS COM *Leishmania infantum*

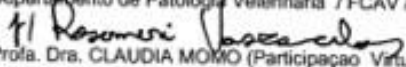
AUTOR: PAULO HENRIQUE LEAL BERTOLO

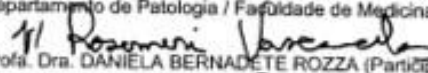
ORIENTADORA: ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

COORIENTADORA: PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA

Aprovado 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 (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. CLAUDIA MOMO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - São Paulo/SP


Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. PAULO FERNANDES MARCUSSO (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Agrárias-UFVJM / Unai/MG


Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA (Participação Virtual)
Universidade de Franca-UNIFRAN / Franca/SP

Jaboticabal, 20 de novembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULO HENRIQUE LEAL BERTOLO – Nascido em 29 de setembro de 1988, na cidade de Belém, Pará, Brasil. Médico veterinário formado no dia 27 de fevereiro de 2013, na Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém – PA. Durante o curso de graduação foi bolsista da referida universidade, na condição de monitor das disciplinas Patologia Geral e Patologia Veterinária, no período de março de 2011 a fevereiro de 2013, sob a orientação do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira e da Profa. Dra. Adriana Maciel de Castro Cardoso. Kursou o Programa de Residência Multiprofissional da Saúde e Área Profissional da Saúde (MEC), na condição de Médico Veterinário residente na área de concentração Patologia Veterinária, no período de 01 de março de 2013 a 28 de fevereiro de 2015, sob a orientação da Profa. Dra. Adriana Maciel de Castro Cardoso e do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira. Após ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal/SP, no curso de Mestrado, na área de concentração em Patologia Animal, no período de 01 de março de 2015 a 20 de fevereiro de 2017, sob a orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, no qual foi bolsista da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Posteriormente iniciou o curso de Doutorado no mesmo Programa de Pós-graduação, na área de concentração em Patologia Animal, em 01 de março de 2017, sob a orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, com bolsa da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.

Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho à minha mãe! Por sempre me
incentivar aos estudos, por maior que fossem as nossas
dificuldades. Te amo mãe!**

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora de Nazaré, pela minha vida, por toda saúde, por sempre me abençoar e me proteger, por me ajudar a conseguir vencer cada obstáculo, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho e, também pelo privilégio de alcançar tantas conquistas por meio da educação.

Aos meus pais, Náira Lucilea Leal Barbosa e Paulo Bertolo. Meus amados pais, agradeço por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Principalmente pela minha mãe! Obrigado por me ensinar a caminhar e assim poder trilhar meu caminho. Por todos os sacrifícios que a senhora fez em prol dos nossos sonhos, por toda educação que me deu, pelos puxões de orelha, pelos conselhos, por todo carinho e amor, pelo meu caráter e meus valores.

Aos meus irmãos, Paula Bertolo e Paulo Bertolo Júnior. Obrigado por aturarem minhas chatices e brigas desde criança, agradeço a amizade, cumplicidade e paciência por entenderem eu estar longe todos esses anos, por apoiarem as minhas escolhas e pela honra de ser o “tio padrinho” de suas filhas.

Aos meus sobrinhos, Juliane, Davi Augusto, Pietra Flor, João Lucas e Poliana, que sempre transmitem alegria, o amor puro das crianças, e que sempre fazem a festa quando volto pra casa, e por compreenderem as ausências do titio durante todos esses anos longe. O titio ama muito cada um de vocês.

À minha namorada, Maria Eduarda. Obrigado por tudo que aconteceu com agente durante todos esses anos, pela amizade, cumplicidade, confiança, pelo teu amor, e por acreditar em todos os nossos sonhos. Obrigado por sempre estar do meu lado, nas nossas quedas e nas nossas conquistas. Agradeço todos os dias pela benção que é dividir meus dias e minha vida contigo. Minha vida mudou quando te encontrei, te amo!

Aos meus “filhos”, Black (*in memorian*), Mérope e Nino. Obrigado por todos os lambeijos e toda forma de demonstrarem o amor mais puro desse mundo. Obrigado pelas companhias nas viagens, cruzando esse “brasilzão” à fora, pelas brincadeiras e pelos momentos inesquecíveis nos passeios no final da tarde pelas ruas ou na UNESP. Amo vocês pra sempre.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, que me abriu as portas dessa universidade sensacional. Obrigado por aceitar me orientar desde o mestrado, mesmo não me conhecendo inicialmente. Obrigado por me aconselhar e me ajudar sempre que foi preciso e por nunca medir esforços para ajudar no meu crescimento profissional e também como pessoa. Obrigado por todas as festinhas no departamento, sempre tentando aliviar o estresse do dia a dia.

À minha família de república, Maria Eduarda, Marcela Moraes, Priscila Del Aguila, Laís Caroline, Ana Claudia, Rodrigo Albuquerque, Laís Caroline, Andrea Piazzon, Leticia Santos, Vivian Tavares, foi muito bom conviver com vocês todos esses anos. Sentirei saudades dos nossos momentos de felicidade, de estudos, de jogar conversas fora durante almoço ou jantar, das festas em Jaboticabal, das comilanças, dos momentos de praticar exercício, das palavras de apoio. Agradeço muito, muito mesmo pela família que a gente formou, vocês foram fundamentais nessa conquista. Vou levar a República Gala-Seca para sempre no meu coração.

Aos meus amigos de Departamento, Pamela Moreira, Mayara Rosolem, Tatianna Frate, Andresa Matsui, Júlio Edward, Gabriela Piovan, Paulo Martinelli, Leticia Bonato, Isabela Perossi, Ana Paula, Rafael Emboaba, Auan Vasconcelos, Jéssica Basso, Mariana Klein, Linda Inês, Alan Polverini, Carolina Paiva, Isabela Junqueira, Marina Carla, Priscila Lisboa e Bethânia Gouvêa. Muito obrigado pelas gargalhadas, pelo auxílio no laboratório, pelos nossos momentos depois do expediente, pelo apoio na organização dos eventos do departamento, pelas festinhas surpresas de aniversário no departamento, pelos conselhos, pelas lições de vida, pelos ensinamentos e por me escutarem tanto. Obrigado pela paciência. Muito, muito obrigado mesmo por deixarem mais leve minha passagem por aqui.

Aos funcionários do Departamento, ao Antônio e a Mabel Custódio por toda colaboração de resolver problemas relacionados ao projeto e documentação, vocês foram maravilhosos.

Aos animais desse estudo, a vocês que partiram para correr em um grande campo ou que viraram uma estrelinha especial para cada família de vocês. Eu queria dizer a vocês que todos os dias de coleta eu rezei bastante e sempre pedia a Deus que recebesse vocês com todo amor e alegria, igual à que vocês demonstraram até o último minuto, desde o momento que entravam naquela sala, e que foi muito dolorido

participar da vida de vocês dessa forma. Eu queria que vocês soubessem que fiz cada análise com o máximo de respeito e que para mim vocês nunca foram um N, sempre entendi que era o amor de uma família que estava ali na minha frente. Meu respeito será eterno!

Ao Rafael Silva Cipriano, médico veterinário do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba, que nos permitiu coletar as amostras no CCZ e também aos funcionários do CCZ, principalmente a Adriana que sempre foi solícita, sempre teve paciência e pela ajuda nas coletas.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV-UNESP, por permitir finalizar mais esta etapa de minha vida profissional.

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

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de tabelas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	2
2.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral Canina.....	2
2.2 Resposta imunológica do cão.....	4
2.3 Alterações clínico-patológicas na LV.....	6
2.4 Influencia hormonal na resposta do sistema imune no tecido mamário.....	7
2.5 Influencia hormonal na resposta imunológica do sistema genital....	9
3. Referências.....	12
CAPÍTULO 2 – Influência dos níveis séricos de progesterona sobre a resposta inflamatória mamária de cadelas com Leishmaniose Visceral*	19
1. Introdução.....	20
2. Metodologia.....	21
2.1 Amostras.....	21
2.2 Colheita do sangue.....	22
2.3 Análise da citologia vaginal.....	22
2.4 Grupos experimentais.....	23
2.5 Avaliação histopatológica.....	23
2.6 Avaliação imuno-histoquímica.....	24
2.7 Análise estatística.....	26

3. Resultados.....	26
4. Discussão.....	35
5. Conclusão.....	41
6. Referências.....	42
Capítulo 3 – Resposta inflamatória do sistema genital de cadelas naturalmente infectadas por <i>Leishmania infantum</i>	50
1. Introdução.....	51
2. Metodologia.....	53
2.1 Amostras.....	53
2.2 Colheita do sangue.....	53
2.3 Análise da citologia vaginal.....	54
2.4 Grupos experimentais.....	54
2.5 Avaliação histopatológica.....	55
2.6 Avaliação imunohistoquímica.....	55
2.7 Análise estatística.....	57
3. Resultados.....	58
4. Discussão.....	68
5. Conclusão.....	73
6. Referências.....	74

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas com *Leishmania infantum***", protocolo nº 009028/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de Julho de 2017.

Vigência do Projeto	01/08/2017 a 26/02/2021
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	30
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Fêmea
Origem	Centro de Controle de Zoonoses - Araçatuba

Jaboticabal, 06 de julho de 2017.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

LESÕES GENITAIS EM CADELAS NATURALMENTE INFECTADAS COM *Leishmania infantum*

RESUMO – O objetivo do trabalho foi avaliar as alterações morfológicas nos segmentos do sistema genital e na glândula mamária de cadelas naturalmente infectadas por *Leishmania infantum* e associar os achados com a imunomarcagem da carga parasitária e das células inflamatórias, bem como, com a fase do ciclo estral nesses animais. Para tanto, foram utilizadas 20 cadelas adultas naturalmente infectadas por *Leishmania infantum*, não castradas, não gestantes e livres de tumores no sistema genital e no tecido mamário. As cadelas foram divididas em dois grupos, sendo G1 (n=9, fase alta de progesterona,) e G2 (n=11, fase baixa de progesterona). A carga parasitária e o imunofenótipo dos leucócitos infiltrados na mama (CD3, CD4, CD8 e MCA874) foram avaliados por meio da imunohistoquímica. No sistema genital a principal alteração histológica foi infiltrado inflamatório mononuclear com distribuição predominantemente ao redor de anexos da pele, a imunomarcagem da carga parasitária e de leucócitos infiltrados foi maior na vulva em relação aos outros segmentos do sistema genital. A presença de parasitas nos segmentos da genitália interna ocorreu mais os animais do grupo G1, com diferença entre os grupos para MCA 874 e linfócito T CD3 nos segmentos de corpo e corno uterino. Já no tecido mamário a principal alteração histológica observada foi inflamação crônica, mais evidente nos animais do grupo G1, porém sem diferença significativa entre os grupos. A carga parasitária e a densidade de células imunomarcadas para CD3, CD4, CD8 e MCA874 foi maior nos animais do grupo G1 ($p<0,05$). A correlação positiva significativa foi observada entre a carga parasitária e os macrófagos e todos os subtipos de linfócitos T. A influência dos hormônios ovarianos parece modular a resposta imune no microambiente uterino e mamário. Aparentemente o efeito imunossupressor/ imunorregulador da progesterona induzindo uma resposta imune do tipo Th2 tanto na mama quanto no trato reprodutivo, favorece uma resposta pró-parasita.

Palavras-chave: Cão, Leishmaniose visceral, glândula mamária, sistema genital, resposta imune, influência hormonal.

GENITAL LESIONS IN BITCHES NATURALLY INFECTED BY *Leishmania infantum*

ABSTRACT – The aim of this study was to assess the morphological changes in the segments of the genital system and breast of bitches naturally infected by *Leishmania infantum* and correlate with parasite load and inflammatory cell, as well as with estrous phase in these animals. Therefore, 20 adults, non-spayed and non-pregnant bitches, were used, they must not have any genital system and breast neoplasm, which were naturally infected by *Leishmania infantum*. They were divided in to groups: G1 (n=9, high progesterone phase) and G2 (n=11, low progesterone phase). The parasite charge and immunophenotype of white cell in the breast (CD3, CD4, CD8 e MCA874) were assessed by immunochemistry. In the genital system, the main histological changes on was mononuclear inflammatory infiltrate with distribution predominantly around skin attachments, the immunostaining of the parasitic load and of infiltrated leukocytes was greater in the vulva in relation to the other segments of the genital system. The presence of amastigotes in the segments of the internal genitalia was high in the G1 group animals. there was a difference between the groups for MCA 874 and CD3 T lymphocyte in the uterine horn and body segments, the other analyzes did not show any difference. Already in breast tissue the histological main change observed was chronic inflammation, more evident in the G1 animals, although there was no statistical difference between the groups. The parasite load and positive cells for CD3, CD4, CD8 e MCA874 were higher in G1 in all variations. A significant positive correlation was observed between parasite load and macrophages and subtypes of T lymphocytes. The hormonal influence seems to modulate the immune answer in the uterine and breast microenvironment. Apparently the immunosuppressive / immunoregulatory effect of the progesterone inducing a Th2 immune answer in both the breast and the reproductive tract, favors a pro-parasite response.

Key words: Dog, Visceral Leishmaniosis, breast, genital system, immune answer, hormonal influence.

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2 – Influência dos níveis séricos de progesterona sobre a resposta inflamatória mamária de cadelas com Leishmaniose Visceral	
Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados na análise imunohistoquímica do tecido mamário de cadelas com Leishmaniose Visceral.....	25
Tabela 2. Alterações histopatológicas e carga parasitária encontradas no tecido mamário de cadelas com Leishmaniose Visceral.....	28
Tabela 3. Mediana $\pm$ faixa interquartil das variáveis mensuradas no sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral.....	34
CAPÍTULO 3 – Resposta inflamatória do sistema genital de cadelas naturalmente infectadas por <i>Leishmania infantum</i>	
Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados na análise imunohistoquímica do sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral.....	57
Tabela 2. Distribuição de ocorrência e intensidade do infiltrado inflamatório histiolinfoplasmocitário nos segmentos do sistema reprodutivo de cadelas com Leishmaniose Visceral.....	61
Tabela 3. Distribuição da média carga parasitária visualizada, em dez campos de maior aumento, no sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral.....	65
Tabela 4. Mediana $\pm$ faixa interquartil das variáveis mensuradas no sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral.....	67

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2 – Influência dos níveis séricos de progesterona sobre a resposta inflamatória mamária de cadelas com Leishmaniose Visceral	
Figura 1. Fotomicrografias das alterações histopatológicas observadas no tecido mamário de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) Infiltrado inflamatório mononuclear na região intralobular e periductal (setas), macrófago com parasita (Detalhe) (Obj. 10x). B) Infiltrado inflamatório mononuclear periductal e leucócito intraluminal (setas) (Obj. 10x). C) Infiltrado inflamatório intralobular (*) e hipertrofia de célula mioepitelial (setas) (Obj. 40x). D) Fibrose interlobular acentuada (*) (Obj. 4x). Hematoxilina-eosina.....	27
Figura 2. Fotomicrografias dos leucócitos presentes no tecido mamário de cadelas com Leishmaniose Visceral. Amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. no citoplasma de macrófagos da região periductal e no lúmen do ducto (detalhe) no grupo G1 (A) e no grupo G2 (B). Imunomarcagem de CD3 em linfócitos periductais nos grupos G1 (C) e G2 (D). Linfócitos CD4 da inflamação periductal (E – G1) e intralobular (F – G2). Marcação de CD8 em linfócitos do infiltrado periductal (G – G1) e intratubular (H – G2). Macrófagos positivos (MCA874) da inflamação intralobular (I - G1; J – G2). Obj. 40x. Complexo de polímeros ligados à peroxidase. Grupo G1 (Fase de progesterona alta); Grupo G2 (Fase de progesterona baixa).....	31
Figura 3. Comparação das médias de células imunomarcadas entre os grupos G1 e G2, com diferença significativa entre os grupos (*) para carga parasitária ($p=0,0213$, Teste de Mann-Whitney), macrófagos (MCA874, $p=0,0020$, teste T não pareado), linfócitos T CD3 ($p=0,0018$, teste T não pareado), linfócitos T CD4 ($p=0,0024$, Teste Mann-Whitney) e linfócitos T CD8 ($p=0,0335$, teste T não pareado). Grupo G1 (Fase de progesterona alta); Grupo G2 (Fase de progesterona baixa).....	32
Figura 4. Avaliação do teste de correlação de Spearman entre os valores de média de células imunomarcadas para carga parasitária e as variáveis da imuno-histoquímica, $p<0,05$. Houve correlação positiva com CD3 ($r = 0,76$; $p < 0,0001$), CD4 ($r = 0,76$; $p < 0,0001$), CD8 ($r = 0,46$; $p = 0,038$) e MCA874 ($r = 0,55$; $p = 0,011$). CD3 (linfócitos T CD3); CD4 (Linfócitos T CD4); CD8 (Linfócitos T CD8); MCA874 (Macrófagos).....	33

Figura 5. Análise de componentes principais (PCA) das medidas de animais do grupo 1 (altos níveis de progesterona) e grupo 2 (baixos níveis de progesterona). Variáveis com maior contribuição apresentam-se coloridas em azul. Triângulos maiores no centro das elipses representam a média dos animais em cada grupo. PB = carga parasitária; MCA874 (macrófagos); subtipos de linfócitos T (CD3, CD4, CD8).....

35

CAPÍTULO 3 – Resposta inflamatória do sistema genital de cadelas naturalmente infectadas por *Leishmania infantum*

Figura 1. Fotomicrografias das alterações histopatológicas na vulva de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) Dermatite vulvar com infiltrado inflamatório multifocal na derme superficial (asterisco) (Obj. 10x). B) Infiltrado inflamatório histiolinfoplasmocitário associado a formas amastigotas de *Leishmania* sp. (detalhe e seta; obj. 100x) ao redor de anexos da vulva (Obj. 10x). C) Distribuição difusa do infiltrado inflamatório com formas amastigotas (detalhe e setas; obj. 100x) na derme vulvar (Obj. 10x). D) Mucosa vulvar com acentuado infiltrado inflamatório histiolinfoplasmocitário com formas amastigotas de *Leishmania* sp. na lâmina própria (detalhe e seta; obj. 100x) (Obj. 10x). Hematoxilina-eosina.....

59

Figura 2. Fotomicrografias das alterações histopatológicas nos demais segmentos do sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) Infiltrado predominantemente de linfócitos na mucosa vaginal (seta) (Obj. 10x). B) Infiltrado linfoplasmocitário multifocal discreto na camada muscular da vagina (seta) (Obj. 10x). C) Foco de infiltrado linfoplasmocitário discreto na lâmina própria da cérvix (seta) (Obj. 10x). D) Infiltrado linfoplasmocitário na camada superficial do endométrio (seta) (Obj. 10x). E) Infiltrado linfoplasmocitário na camada superficial e intermediária do endométrio (seta) (Obj. 10x). F) Infiltrado predominantemente linfoplasmocitário associado a macrófagos espumosos no tecido conjuntivo do ovário adjacente a um corpo lúteo (Obj. 10x). Hematoxilina-eosina.....

60

Figura 3. Fotomicrografias da presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) Derme vulvar com presença de formas amastigotas intracitoplasmáticas em macrófagos ao redor de anexos (detalhe) (Obj. 40x). B) Formas amastigotas intracitoplasmáticas em macrófagos na lâmina própria da vagina (detalhe) (Obj. 40x). C) Formas amastigotas no citoplasma de macrófagos logo abaixo do epitélio (asterisco) da cérvix (detalhe) (Obj. 40x). D) Formas amastigotas no citoplasma de macrófagos logo abaixo do epitélio (asterisco) do corpo do útero (detalhe) (Obj. 40x). E) Formas amastigotas no citoplasma de macrófagos em meio a inflamação

63

perivascular na camada do estrato vascular (detalhe) do corpo do útero não acometendo o miométrio longitudinal (asterisco) (Obj. 40x). F) Formas amastigotas no citoplasma de macrófagos em meio a inflamação no endométrio do corno uterino (detalhe) próximo as glândulas endometriais (asterisco) (Obj. 40x). G) Formas amastigotas intracitoplasmáticas de macrófagos em meio a inflamação perivascular na camada do estrato vascular (detalhe) do corno uterino logo abaixo do miométrio circular (asterisco) (Obj. 40x). H) Formas amastigotas no citoplasma de macrófago no corpo lúteo no ovário (detalhe) (Obj. 100x).....

Figura 4. Fotomicrografias da análise imunohistoquímica no sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) Imunomarcção na membrana de linfócitos T CD3 na lâmina própria e no epitélio vaginal (Obj. 40x). B) Imunomarcção na membrana de linfócitos T CD3 distribuídos pelo endométrio do corno uterino (Obj. 40x). C) Marcação citoplasmática de linfócitos CD8 na lâmina própria da cérvix (Obj. 40x). D) Imunomarcção citoplasmática de linfócitos CD4 distribuídos no endométrio do corpo do útero (Obj. 40x). E) Imunomarcção citoplasmática de linfócitos CD4 distribuídos no endométrio do corno uterino (Obj. 40x). F) Imunomarcção positiva em macrófagos no corpo lúteo presente no ovário (Obj. 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.....

64

Figura 5. Comparação das médias de células imunomarcadas entre os grupos G1 e G2, com diferença significativa entre os grupos (*). A) Para o anticorpo MCA 874 no corpo do útero ($p = 0,020$) e corno uterino ($p = 0,041$) (Teste T não pareado). B) Para o anticorpo CD3 no corpo do útero ($p = 0,002$) e corno uterino ($p = 0,004$) (Teste T não pareado). Grupo G1 (Fase de progesterona alta); Grupo G2 (Fase de progesterona baixa).....

66

Figura 6 - Análise de componentes principais (PCA) das medidas de animais do grupo 1 e grupo 2. Variáveis com maior contribuição apresentam-se coloridas em azul. Círculos maiores no centro das elipses representam a média dos animais em cada grupo. PB = carga parasitária. VE = Vulva epiderme. UTN = corno do útero. UTR = corpo do útero. VA = vagina. CX = cérvix. OV = ovário.....

68

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

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

Esta doença pode acometer o ser humano, o cão e os animais silvestres (Brasil, 2014). O agente etiológico é o protozoário *Leishmania infantum* (Baneth et al., 2008). A transmissão da LV no hospedeiro vertebrado se dá pela ação hematófaga de insetos vetores da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Barata et al., 2004). O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* pode albergar o parasita, mas ainda não está comprovada a sua capacidade de transmitir a forma infectante de *Leishmania* spp. (promastigota metacíclica) para o hospedeiro canino (Dantas-Torres et al., 2011). Todavia, a transmissão vertical transplacentária em cadelas (Rosypal et al., 2005), bem como a transmissão venérea (Silva et al., 2009), têm sido relatadas e, essas rotas alternativas de transmissão podem desempenhar um papel epidemiológico na disseminação e manutenção da doença, especialmente em áreas onde o mosquito vetor está ausente (Turchetti et al., 2014).

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

A LV canina é uma doença multissistêmica com sinais clínicos variáveis (Baneth et al., 2008). A maioria dos cães apresentam linfadenomegalia, emagrecimento progressivo, esplenomegalia, hepatomegalia, dermatopatias, conjuntivite, atrofia muscular, desordens neurológicas, onicogribose, dentre outros (Solano-Gallego et al., 2011).

Alguns autores já relataram a presença de formas amastigotas de *Leishmania infantum* no sistema genital e tecido mamário de cadelas (Rosypal et al., 2005; Silva et al., 2008; Boechat et al., 2016; Magro et al., 2017). No entanto, a literatura é escassa ao relatar as lesões associadas ao sistema genital e glândula mamária de cadelas com LV e pouco se sabe sobre a atuação do sistema imune nesses tecidos. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar as alterações histopatológicas no sistema genital e na glândula mamária de cadelas infectadas por *Leishmania infantum* e relacionar estes achados com o período do ciclo estral em que há maior ou menor concentração de progesterona, com a carga parasitária local e com o imunofenótipo do infiltrado inflamatório local.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral canina

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

Nos centros urbanos os principais reservatórios da LV são os cães (Silva, 2007), tornando-os importantes no ciclo de transmissão da doença (Solano-Gallego et al., 2011), visto que apresentam infecção mais prevalente que a infecção humana, e os assintomáticos albergam parasitos na derme (Queiroz et al., 2010; Moreira et al., 2013).

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

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

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

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

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

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

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

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

Outras maneiras de transmissão sem a participação do mosquito vetor também já foram relatados, como transmissão por transfusão sanguínea (Freitas et al., 2006; Tabar et al., 2008), vertical transplacentária (Rosypal et al., 2005; Boggiatto et al., 2011) e venérea (Silva et al., 2009). Lembrando que essas formas alternativas de transmissão podem desempenhar um papel epidemiológico na disseminação e manutenção da doença, especialmente em áreas onde o mosquito vetor está ausente (Turchetti et al., 2014).

2.2 Resposta imunológica do cão

A infecção por *L. infantum* está relacionada a interações complexas entre as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro, que determinam a eliminação ou persistência e multiplicação do parasita. A resposta imune inata tem um papel importante na proteção contra o parasita, além de instruir o desenvolvimento de resposta adaptativa de longa duração (Hosein et al., 2017).

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

Pelo fato do parasita ser intracelular obrigatório, a defesa imunológica depende da atividade dos linfócitos T (Barbiéri, 2006). Os linfócitos T CD4 podem se diferenciar em subpopulações de linfócitos efetores, sendo denominados linfócitos T auxiliares 1

(Th1), linfócitos T auxiliares 2 (Th2), linfócitos T auxiliares 17 (Th17) e os linfócitos T regulatórios (Treg) (Hailu et al., 2005).

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

Nos animais resistentes à infecção, as APCs produzem Interleucina 12 (IL-12), uma citocina que promove a diferenciação de linfócitos T na subpopulação Th1 (Barbiéri, 2006). As citocinas produzidas pela resposta do tipo Th1 influenciam no aumento da produção e proliferação de linfócitos e na atuação citotóxica das células T CD8, mantendo o aspecto clínico saudável no animal (Pinelli et al., 1999). Os linfócitos T citotóxicos CD8 estão envolvidos na resistência a doença nos cães, sendo responsáveis pela lise dos macrófagos infectados com *Leishmania* spp. e pelo aumento da síntese de INF- γ e TNF- α (Barbiéri, 2006).

A susceptibilidade está relacionada à ativação de células Th2, que produzem resposta imune humoral, caracterizada por citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que suprimem a ação dos macrófagos e estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos, que são ineficientes contra o parasita, permitindo a progressão e persistência da doença (Hailu et al., 2005; Barbiéri, 2006). Portanto, nos animais susceptíveis a produção de IL-4 desencadeia a diferenciação de linfócitos T nas subpopulações de células Th2 (Barbiéri, 2006), que levam ao aumento da produção de citocinas como IL-10 e Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), que inibem a resposta efetiva Th1, contribuindo para o estabelecimento da infecção (Alves et al., 2009). As células Treg são subpopulações de linfócitos T CD4 que apresentam atividade supressiva, importante para a manutenção da homeostasia imunológica, por meio da interação célula-célula e/ou pela produção de citocinas como a IL-10 e TGF- β e que podem favorecer a sobrevivência do parasita (Belkaid e Tarbell, 2009).

A diferenciação para subpopulações de células Th1 e Th2 está relacionada a três fatores: as citocinas presentes no ambiente da estimulação, o tipo de APCs e a

natureza e quantidade do antígeno (Hailu et al., 2005). Para Reis et al. (2006), moléculas presentes na saliva do flebótomo atuam suprimindo a resposta inflamatória na pele e na modulação de citocinas, sendo capazes de bloquear a resposta imunológica do tipo Th1 e estimular a do tipo Th2.

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

2.3 Alterações clínico-patológicas na LV

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

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

Dentre as alterações clínico-patológicas, as mais comuns são hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, diminuição da proporção albumina/globulina, anemia não regenerativa, leucocitose ou leucopenia, trombocitopenia, proteinúria, enzimas hepáticas elevadas, azotemia renal. Os sinais clínicos da doença são

caracterizados por linfadenomegalia generalizada, emagrecimento progressivo, esplenomegalia, hepatomegalia, dermatopatias, conjuntivite, úlceras crostosas na ponta dos pavilhões auriculares, focinho e região periorbital e, observa-se também atrofia muscular, desordens neurológicas, onicogribose, dentre outros (Solano-Gallego et al., 2011).

As formas amastigotas do parasita, que estão presentes dentro de macrófagos, podem ter uma ampla distribuição em tecidos de cães (Reis et al., 2009), incluindo o sistema reprodutor feminino (Rosypal et al., 2005; Silva et al., 2008; Boechat et al., 2016). Em cadelas naturalmente infectadas já foi detectada a presença de *Leishmania infantum* na vulva, vagina, cérvix, útero e ovário. As lesões genitais mais comumente observadas nestas cadelas foram dermatite vulvar, seguida de vaginite, com inflamação crônica associada ou não a formação de granulomas, predominante ao redor de anexos cutâneos na vulva (Silva et al. 2008; Boechat et al. 2016).

A presença de formas amastigotas de *Leishmania infantum* foi observada no tecido mamário de cadelas, com distribuição intra e interlobular, ao redor e no lúmen ductal. Os parasitas estavam associados ao infiltrado inflamatório mononuclear intramamário (Boechat et al., 2016).

2.4 Influencia hormonal na resposta do sistema imune no tecido mamário

Os leucócitos residentes do tecido mamário, principalmente macrófagos, eosinófilos e mastócitos são fundamentais para o desenvolvimento do tecido mamário desde a fase embrionária, sendo responsáveis pela formação de ductos bem ramificados durante a puberdade, enquanto os linfócitos T e B são praticamente ausentes (Coussens e Pollard, 2011).

Nas mulheres, as células imunes estão predominantemente localizadas nos lóbulos mamários, em vez de estroma e gordura. Na mama normal, as células imunes mais numerosas nos lóbulos são macrófagos, células dendríticas e linfócitos T CD8, enquanto que os linfócitos T CD4 e linfócitos B estão completamente ausentes. Estas duas últimas populações estão em quantidade elevada nos processos inflamatórios da mama (Degnim et al., 2014).

As células dendríticas e os linfócitos T CD8 são observadas em íntima associação com o epitélio dos ácinos mamários, sugerindo respectivamente um papel na apresentação de antígenos e na função efetiva do sistema imunológico, bem como, na resposta ao estresse e na manutenção da integridade epitelial (Degnim et al., 2014).

A glândula mamária é considerada um tecido com imunidade de mucosa, devido a dependência do epitélio mamário das células imunes durante o seu desenvolvimento. Essa íntima associação imune-epitelial na mama normal apoia a biologia de mucosa (Bets et al., 2018). O sistema imunológico da mucosa da mama pode desempenhar um papel crítico na imunovigilância do tumor, apoiado no papel previamente estabelecido para as células T CD8 e células dendríticas nesse processo (Degnim et al., 2014).

As células imunes circulantes podem entrar no tecido mamário e transitar pelo epitélio acinar e ductal e podem até mesmo ser eliminadas no leite (Seelig e Beer, 1978). No tecido mamário, os macrófagos e as células dendríticas têm a capacidade de eliminar determinados patógenos e estimular a resposta imune adaptativa. Essas células fagocitam patógenos e processam peptídeos antigênicos dos patógenos que são apresentados pelo MHC ao linfócito T, iniciando a ativação de uma resposta imune adaptativa. A resposta imune celular adaptativa na glândula mamária é mediada por células T efectoras. Os linfócitos T CD4 e CD8 estimulados podem se diferenciar nas respostas Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg) (Butler et al., 2015).

A variação da concentração dos níveis séricos de estrógeno e progesterona, durante o ciclo reprodutivo em mulheres e camundongos, influenciam a morfogênese da glândula mamária e as populações de células imunes necessárias para o desenvolvimento normal. Esta influência hormonal sobre estas células também pode contribuir para o aumento do risco de câncer de mama mediado por hormônios (Need et al., 2014).

A proliferação mamária de células epiteliais, em mulheres e camundongos, ao longo do ciclo reprodutivo revelou que é mais alta durante a fase luteínica e está positivamente associada à concentração sérica de progesterona e depois regridem durante a fase folicular (Fata et al., 2001; RamaKrishnan et al., 2002; Navarrete et al., 2005).

Além disso, estrogênio, progesterona e prolactina podem modular a inflamação, tanto sistêmica quanto localmente na glândula mamária. Os efeitos destes hormônios nas células imunes podem ser diretos ou indiretos, através dos componentes da glândula mamária regulados hormonalmente pelas células epiteliais e estroma da mama. Os efeitos diretos dos hormônios sobre as células imunes são mediados quando estas células expressam receptores de estrogênio, progesterona e prolactina, que são ativados por seus respectivos ligantes. Os efeitos indiretos do estrogênio, progesterona e prolactina nas células imunes são mediados por sinais parácrinos das células epiteliais mamárias e estroma (Need et al., 2014).

O ambiente imunológico da glândula mamária, relatado na mulher e em modelos murinos, é afetado durante as diferentes fases do ciclo menstrual/estral em resposta a estímulos hormonais. Durante a fase lútea, a progesterona possui um papel imunorregulador, induzindo uma resposta inflamatória predominante com perfil Th2 que secretam citocinas imunomodulatórias como IL 4 e IL 10 e, consequente inibição do perfil Th1 (Faas et al., 2000, Miyaura e Iwata, 2002).

Em modelos murinos, a quantidade de macrófagos na glândula mamária sofre influência do ciclo estral, com um pico nas fases de maior concentração da progesterona (Chua et al., 2010). No entanto, os hormônios ovarianos como a progesterona regulam os macrófagos mamários para um fenótipo de remodelação tecidual, com menor expressão de marcadores imunes críticos, como o MHC classe II, menor secreção de citocinas inflamatórias, diminui a apresentação antigênica e a capacidade de vigilância imunológica do macrófago, limitando a sua função de estimular a resposta imune adaptativa contra patógenos (Hodson et al., 2013).

2.5 Influencia hormonal na resposta imunológica do sistema genital

O sistema imune, especialmente no endométrio, tanto de mulheres como de animais mostra que além da regulação da proteção imunológica contra agentes infecciosos, o endométrio também deve se adaptar a vários estímulos recorrentes, incluindo o contato periódico com células estranhas, como o espermatozóide alogênico ou o embrião, que não devem ser rejeitados, como ocorreria com qualquer agente infeccioso (Aflatoonian et al., 2007; Horne et al., 2008). O sistema imune também

contribui na recuperação de eventos fisiológicos particulares, como ocorre durante a involução pós-parto (Kutteh et al., 2005; Wira et al., 2008).

O sistema imunológico endometrial é constituído por dois componentes diferentes: as células epiteliais do endométrio (Quayle 2002) e as células imunes endometriais residentes, como células NK, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B; bem como um componente molecular, e várias imunoglobulinas e citocinas produzidas localmente, envolvidas na regulação das funções imunológicas (Horne et al. 2008). O recrutamento das células imunes residentes não é completamente compreendido, mas os vasos endometriais podem ser responsáveis por uma infiltração rápida de células imunes em situações de injúria (Wira et al. 2008). A migração de células imunes para o endométrio está aumentada durante o período pós-parto (Jiwakanon et al. 2006), e em caso de inflamação (Wira et al. 2008).

Os leucócitos residentes no endométrio, sob a influência dos hormônios ovarianos, sofrem alterações de acordo com a variação cíclica em mulheres (Wira et al., 2014), porcas (Dalin et al., 2004), vacas (Ohta et al., 2013) e nas cadelas (Pires e Payan-Carreira, 2015). Portanto, os reguladores mais óbvios a serem considerados para imunidade inata e inflamação no endométrio são os esteroides ovarianos, que controlam a fisiologia do endométrio, peptídeos antimicrobianos e uma infinidade de células imunes regulatórias que podem ser encontradas no endométrio (Wira et al., 2014).

A imunidade inata no sistema genital inclui as barreiras fisiológicas da pele e as células epiteliais da mucosa, peptídeos antimicrobianos e o sistema complemento, células apresentadoras de antígeno, monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e células natural killer, bem como, ajudar a direcionar a resposta imune adaptativa por meio de interações com células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T (Turner et al., 2012).

De acordo com a literatura, a população de células imunes residentes no endométrio é diferente entre as espécies, tanto na proporção quanto no padrão de distribuição (Pires e Payan-Carreira, 2015). Nas mulheres, os linfócitos T são o tipo mais abundante de leucócitos no endométrio, enquanto macrófagos e linfócitos B

estão presentes em menor número e formando pequenos agregados no estroma endometrial (Kutteh et al., 2005).

Em gatos, os macrófagos são as células imunes mais representativas no endométrio, seguidos por proporções semelhantes de linfócitos T e B (Butterworth et al., 2001). Na porca, os macrófagos estão presentes principalmente durante o proestro e o estro, enquanto os linfócitos são as células imunes mais prevalentes durante todo o ciclo estral e estavam localizados predominantemente no estroma subepitelial (Kaeoket et al., 2001). Na cadela a proporção relativa das populações de células imunes no endométrio era de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. Esses leucócitos estão em maior quantidade no endométrio nas fases de anestro e proestro, sendo que o número de linfócitos T é substancialmente menor nos estágios associados a progesterona, enquanto os linfócitos B e macrófagos permanecem em números estáveis. Essa mudança no número de linfócitos T pode explicar por que a cadela é mais suscetível à inflamação endometrial quando a progesterona está acima dos valores basais (Pires e Payan-Carreira, 2015).

A ação hormonal sobre o sistema imune materno, as citocinas liberadas no meio, o controle da citotoxicidade direta das células natural killer uterinas e a atividade das células T regulatórias influenciam o fenômeno de tolerância, o desenvolvimento fetal e a formação placentária (Michelon et al., 2006).

Os hormônios estrógeno e progesterona afetam e modulam a ação do sistema imune durante as diferentes fases do ciclo estral. Na literatura é fato conhecido que o útero está mais susceptível a infecções durante a fase progesterônica e durante a gestação (Foster, 2013).

O estrógeno aumenta localmente a resistência uterina contra bactérias e ativa sistemicamente as células T CD4 e ativa uma resposta imune Th1, contribuindo assim para a resistência genital feminina (Sugiura et al. 2004). Por outro lado, a progesterona possui efeito imunorregulatório sobre linfócitos T. Estes leucócitos passam a sintetizar uma proteína imunomodulatória, o fator bloqueador induzido pela progesterona (PIBF), que inibe a liberação de ácido araquidônico, a atividade de células NK e modifica o equilíbrio de citocinas, favorecendo uma resposta imune do tipo Th2 (IL-3, IL-4 e IL-10) neste ambiente. Paralelamente, inibe as citocinas Th1, como IFN- γ (Szekeres-Bartho et al., 2005; Daher e Mattar, 2009).

A progesterona também promove a diminuição do número de células NK periféricas e ativação da citotoxicidade por ação direta nas células NK e/ou por meio da promoção de citocinas Th2 e da produção da PIBF pelas células T. As células do endométrio, por influência da progesterona, produzem IL-15 e prolactina, que regulam a proliferação das células NK, a diferenciação e produção de citocinas e de outras moléculas que suportam o desenvolvimento da placenta e do trofoblasto, promovendo a modulação local (Neves et al., 2007). Além disso, o efeito imunossupressor da progesterona e a presença de células do sistema imunológico que inibem a resposta inflamatória, ocorre a modulação de macrófagos para o imunofenótipo M2, que secretam IL-3, IL-4 e IL-10. Essas adaptações ocorridas na imunidade uterina para manter o conceito alogênico durante a gestação, podem persistir e favorecer a presença de microrganismos invasores (Hansen, 2013).

Baseado nos pressupostos supracitados, a hipótese do presente estudo baseia-se no efeito imunossupressor da progesterona sobre a resposta imune da glândula mamária e do sistema genital de cadelas com LV, o qual cria um microambiente favorável a persistência da *Leishmania infantum* nestes tecidos.

3. REFERÊNCIAS

Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliott SL, Bruce C, Aflatoonian A, Li TC, Fazeli A (2007) Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. **Human Reproduction** 22:586–593.

Alves CF, Amorim IF, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, Kalapothakis E, Bruna-Romero O, Tafuri WL, Teixeira MM, Melo MN (2009) Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 128:349-358.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L (2008) Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part one. **Trends in Parasitology** 24:324-330.

Barata RA, Silva JCF, Costa RT, Dias CLF, Silva JC, Paula EV, Prata A, Monteiro EM, Dias ES (2004) Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, an Area of American Visceral

Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 99:481-487.

Barbiéri CL (2006) Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology** 28:329-337.

Belkaid Y, Tarbell K (2009) Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annual Review of Immunology** 27:551–589.

Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA (2011) Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 4:e1019.

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

Butler JE, Rainard P, Lippolis J, Salmon H, Kacs Kovics I (2015) The Mammary Gland in Mucosal and Regional Immunity. In: Mestecky J, Strober W, Russell M, Cheroutre H, Lambrecht BN, Kelsall B (Eds.) **Mucosal immunology**. 4th ed. Massachusetts: Academic press, p. 2269-2306.

Butterworth JL, English RV, Jordan HL, Tompkins MB (2001) Distribution of immune cells in the female reproductive tract in uninfected and FIV infected cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 83:37–51.

Carvalho Neta AV, Paixão TA, Silva FL, Santos RL (2007) Panoftalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso. **Clínica Veterinária** 12:52-56.

Chua AC, Hodson LJ, Moldenhauer LM, Robertson SA, Ingman WV (2010) Dual roles for macrophages in ovarian cycle-associated development and remodelling of the mammary gland epithelium. **Development** 137:4229-4238.

Daher S, Mattar R (2009) Gestação: um fenômeno imunológico? **Revista brasileira de alergia e imunopatologia** 32:63-67.

Dalin AM, Kaeoket K, Persson E (2004) Immune cell infiltration of normal and impaired sow endometrium. **Animal Reproduction Science** 82:401-413.

Dantas-Torres F, Latrofa SM, Otranto D (2011) Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors** 4:1-4.

Faas M, Bouman A, Moesa H, Heineman MJ, De Leij L, Schuiling G (2000) The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? **Fertility and Sterility** 74:1008-1013.

Fata JE, Chaudhary V, Khokha R (2001) Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17 β - estradiol during the estrous cycle. **Biology of Reproduction** 65:680–688.

Foster RA (2016) Female reproductive system and mammae. In: Zachary JF, McGavin MD (Eds.) **Pathologic Basis of Veterinary Disease**, 6th edn. Elsevier, St Louis, p. 1085-1126.

Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalick MS (2006) Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology** 137:159-167.

Hailu A, Baarle D, Knol GJ, Berhe N, Miedema F, Kager PA (2005) T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and symptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clinical Immunology** 117:182-191.

Hansen PJ (2013) Maternal immunological adjustments to pregnancy and parturition in ruminants and possible implications for postpartum uterine health: is there a prepartum-postpartum nexus? **Journal of Animal Science** 91:1639- 1649.

Hodson LJ, Chua AC, Evdokiou A, Robertson SA, Ingman WV (2013) Macrophage phenotype in the mammary gland fluctuates over the course of the estrous cycle and is regulated by ovarian steroid hormones. **Biology of Reproduction** 89: 65.

Horne AW, Stock SJ, King AE (2008) Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. **Reproduction** 135:739-749.

Hosein S, Blake D, Solano-Gallego L (2017) Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology** 144:95–115.

Jiwakanon J, Persson E, Dalin AM (2006) The endometrium of the anoestrous female pig: studies on infiltration by cells of the immune system. **Reproduction in Domestic Animals** 41:191-195.

Kaeoket K, Persson E, Dalin AM (2001) The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. **Animal Reproduction Science** 65:95-114.

Kutteh WH, Mestecky J, Wira CR (2005) Mucosal immunity in the human female reproductive tract. In: Mestecky JL, Ogra ML, Strober P, Bienenstock W, McGhee J, Mayer L (Eds.) **Mucosal Immunology**. 3rd edn. Academic Press, Amsterdam, p. 1631-1646.

Michelon T, Silveira JG, Graudenz M, Neumann J. Imunologia da gestação. **Revista AMRIGS** 50:145-151.

Miyaura H, Iwata M (2002) Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. **The Journal of Immunology** 168:1087-1094.

Moreira PRR, Bandarra MB, Magalhães GM, Munari BDP, Machado GF, Prandini MM, Alessi AC, Vasconcelos RO (2013) Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology** 196:149-157.

Navarrete M, Maier CM, Falzoni R, Quadros L, Lima GR, Baracat EC, Nazário ACP (2005) Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Breast Cancer Research** 7:R306–R313.

Need EF, Atashgaran V, Ingman WV, Dasari P (2014) Hormonal regulation of the immune microenvironment in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia** 19:229–239.

Neves C, Medina JL, Delgado JL (2007) Alterações endócrinas e imunomodulação na gravidez. **Arquivo de Medicina** 21:175-182.

Ohta T, Koshi K, Ushizawa K, Hosoe M, Takahashi T, Yamaguchi T, Kizaki K, Hashizume K (2013) Dynamics of CD3 + T-cell distribution throughout the estrous

cycle and gestation in the bovine endometrium. **Journal of Reproduction and Development** 59:507-511.

Pinelli E, Rutten VPMG, Brusters M, Moore PF, Ruitenberg EJ (1999) Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity** 67:237–243.

Pires MA, Payan-Carreira R (2015) Resident macrophages and lymphocytes in the canine endometrium. **Reproduction in Domestic Animals** 50:740-749.

Quayle AJ (2002) The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. **Journal of Reproductive Immunology** 57:61-79.

Queiroz NMGP, Assis J, Oliveira TMFS, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA (2010) Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 19:32-38.

Ramakrishnan R, Khan SA, Badve S (2002) Morphological changes in breast tissue with menstrual cycle. **Modern Pathology** 15:1348–1356.

Reis L, Brito M, Souza M, Pereira V (2006) Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista de Patologia Tropical** 35:103-115.

Reis AB, Martins-Filho AO, Carvalho AT, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Oliveira RC (2009) Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 128:87-95.

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS (2005) Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology** 91:970–972.

Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin AF, Lima VMF (2007) An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology** 150:283-290.

Santos-Gomes GM, Rodrigues OR, Marques C (2008) Resposta imunológica. In: Santos-Gomes GM, Pereira da Fonseca IM (Eds.) **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, p. 69-82.

Serrano ACM, Nunes CM, Savani ESM, D'uria SRN, Bonello FL, Vasconcelos RO, Lima VMF, Bresciani KDS (2008) Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba, SP – relato de caso. **Clínica Veterinária** 13:36-40.

Silva FS (2007) Patologia e Patogênese da Leishmaniose Visceral Canina. **Revista Trópica: ciências agrárias e biológicas** 1:20.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL (2009) Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology** 160:55-59.

Solano-Gallego L, Baneth G (2008) Canine leishmaniosis – a challenging zoonosis. **European Journal of Companion Animal Practice** 18:232–241.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors** 4:1-16.

Sugiura K, Nishikawa M, Ishiguro K, Tajima T, Inaba M, Torii R, Hatoya S, Wijewardana V, Kumagai D, Tamada H, Sawada T, Ikehara S, Inaba T (2004) Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. **Immunobiology** 209:619–627.

Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Palkovics T, Papp O, Varga P (2005) Progesterone-dependent immunomodulation. **Chemical Immunology and Allergy** 89:118-125.

Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L, Ruiz de Gopegui R (2008) Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. **Journal Small Animal Practice** 49:325-328.

Tomás A, Romão SF (2008) Biologia do parasita. In: Santos-Gomes GM, Pereira da Fonseca IM (Eds.) **Leishmaniose canina**. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações, p. 7-26.

Turchetti AP, Souza TD, Paixão TA, Santos RL (2014) Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **Journal of Infection Developing Countries** 8:403-407.

Turner ML, Healey GD, Sheldon IM (2012) Immunity and Inflammation in the uterus. **Reproduction in Domestic Animals** 47: 402-409.

Wilson NS, Villadangos JA (2004) Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. **Immunology and Cell Biology** 82:91-98.

Wira CR, Fahey JV, Schaefer TM, Pioli PA, Sentman CL, Shen L, 2008: Innate and adaptive immunity in the human female reproductive tract: influence of the menstrual cycle and menopause on the mucosal immune system in the uterus. In: Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC (Eds.) **The endometrium: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives**. 2nd ed. Informa Healthcare, London, p. 493-523.

Wira CR, Fahey JV, Rodriguez-Garcia M, Shen Z, Patel MV (2014) Regulation of mucosal immunity in the female reproductive tract: the role of sex hormones in immune protection against sexually transmitted pathogens. **American Journal of Reproductive Immunology** 72: 236-258.

CAPÍTULO 2 – Influência dos níveis séricos de progesterona sobre a resposta inflamatória mamária de cadelas com Leishmaniose Visceral*

Paulo Henrique Leal Bertolo^a, Maria Eduarda Bastos Andrade Moutinho da Conceição^a, Rafael Rocha Mello Emboaba da Costa^a, Ana Paula Prudente Jacintho^a, Rafael Silva Cipriano^b, Pamela Rodrigues Reina Moreira^c, Maricy Apparicio^a, Gisele Fabrino Machado^d, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos^a

^aUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

^bCentro de Controle de Zoonoses, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

^cCentro Universitário de Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

^dUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Autor para correspondência: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Tel.: +55 16 3209 7368. E-mail: rosemeri.vasconcelos@unesp.br

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar as alterações histopatológicas na glândula mamária de cadelas com Leishmaniose Visceral e associar os achados com a carga parasitária, com o perfil das células inflamatórias no tecido mamário e com a fase do ciclo estral. Para tanto, foram utilizadas 20 cadelas adultas naturalmente infectadas por *Leishmania infantum*, não castradas, não gestantes e livres de tumores mamários. As cadelas foram divididas nos grupos G1 (n=9, níveis séricos elevados de progesterona) e G2 (n=11, níveis séricos baixos de progesterona). A carga parasitária e o imunofenótipo dos leucócitos infiltrados na mama (CD3, CD4, CD8 e MCA874) foram avaliados por meio da técnica de imunohistoquímica. Na mama verificou-se principalmente no grupo G1, inflamação crônica, por vezes associada com granulomas, maior carga parasitária e densidade de células imunomarcadas para CD3, CD4, CD8 e MCA874. Correlação positiva significativa foi observada em G1, entre a carga parasitária e os leucócitos imunomarcados. A influência da progesterona contribuiu para a modulação do perfil celular da inflamação, para um possível fenótipo

*Este capítulo foi redigido segundo as normas da revista Veterinary Parasitology

imunossupressor no microambiente mamário, o qual favoreceu a persistência da infecção.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, resposta imune, influência hormonal, glândula mamária, Cão.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose cosmopolita que acomete o homem, o cão e os animais silvestres. Os cães são os principais hospedeiros e reservatórios da doença em áreas urbanas (Brasil, 2014). A LV é endêmica em aproximadamente 50 países distribuídos na Ásia, Europa, África e América do Sul (Campino e Maia, 2018). O agente etiológico no continente americano é o protozoário *Leishmania infantum* (Baneth et al., 2008) e a transmissão ocorre pela ação hematófaga do vetor, o mosquito *Lutzomyia longipalpis* (Barata et al., 2004).

As formas amastigotas do parasita presentes no citoplasma de macrófagos distribuem-se de forma sistêmica, a partir do sítio cutâneo de infecção em cães (Reis et al., 2009), atingindo também o sistema reprodutor feminino (Rosypal et al., 2005; Silva et al., 2008; Boechat et al., 2016). No cão o agravamento da LV está associado a fatores relacionados ao parasito e à resposta imune do hospedeiro (Santos-Gomes et al., 2008). O estudo da resposta do hospedeiro é imprescindível para a compreensão do processo infeccioso e caracterização da doença (Barbiéri, 2006).

Os hormônios esteroides, como o estrógeno e a progesterona, são importantes reguladores da imunidade no sistema reprodutor, nas diferentes fases do ciclo estral (Herath et al., 2006). A progesterona influencia na tolerância imunológica local pela indução da ativação preferencial de células com perfil Th2, como macrófagos M2 e linfócitos T regulatórios (Daher e Mattar, 2009, Pereira et al., 2019), que contribuem

com a produção das citocinas IL-3, IL-4 e IL-10, associadas a um efeito imunossupressor. Paralelamente, este hormônio também inibe a resposta imune Th1 e a produção de citocinas como INF- γ , potente ativadora de macrófagos (Szekeres-Bartho et al., 2005).

Na LV, a presença de formas amastigotas de *Leishmania infantum* foi observada no tecido mamário de cadelas, com distribuição intra e interlobular, ao redor e no lúmen ductal. Os parasitas estavam associados ao infiltrado inflamatório mononuclear intramamário (Boechat et al., 2016).

A literatura é escassa ao relatar alterações mamárias em cadelas com LV e pouco se sabe sobre a atuação do sistema imune na glândula mamária desses animais. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar as alterações morfológicas na mama de cadelas infectadas por *Leishmania infantum* e relacionar estes achados com os níveis de progesterona (alto e baixo), com a carga parasitária local e com o imunofenótipo do infiltrado inflamatório intramamário.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras

No estudo foram utilizadas 20 cadelas, adultas, não castradas, não gestantes, sem predileção por raça e livres de tumores mamários. Todas as cadelas foram diagnosticadas positivas para *Leishmania* spp., por meio de teste imunoenzimático (ELISA) e/ou teste rápido imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP®) e por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) do linfonodo poplíteo. Os animais eram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do município de Araçatuba (21° 12'32" Sul e 50° 25'58" oeste), estado de São Paulo, área endêmica para Leishmaniose Visceral (Moreira et al., 2010).

2.2 Coleta do sangue

Para a coleta do sangue periférico, os animais foram contidos fisicamente e submetidos à venopunção da jugular externa. O sangue coletado foi acondicionado em tubo contendo gel separador de coágulo (Ampulab, Belo Horizonte-MG, Brasil), para obtenção do soro, para a posterior dosagem dos níveis séricos de progesterona. As amostras de soro sanguíneo foram obtidas por centrifugação (1500 rpm x 10min) do sangue total, sem anticoagulante e após armazenadas em microtubos e congeladas a -20°C, até o momento da realização da dosagem hormonal por ensaio imuno-enzimático, pelo método de quimioluminescência (Immulite, Siemens), em laboratório autônomo.

2.3 Análise da citologia vaginal

A citologia vaginal foi realizada com a utilização de escovas ginecológicas estéreis. Os esfregaços foram corados com Panótico rápido (Laborclin, cód. 620529) e avaliados em microscopia de luz, para a determinação das porcentagens de células parabasais, intermediárias e superficiais (Root Kustritz, 2006), a fim de se identificar as fases do ciclo estral das cadelas.

O anestro é caracterizado pela predominância de células parabasais e intermediárias, com ausência de células superficiais. No proestro observa-se um padrão misto de células parabasais e intermediárias e, poucas células superficiais. Durante o estro verifica-se aumento substancial de células superficiais, que correspondem a mais de 80% das células do esfregaço, bem como a presença de menos de 5% de células parabasais ou intermediárias. No diestro observa-se a redução de 20% das células superficiais e aumento de pequenas células intermediárias, além da presença de neutrófilos (Root Kustritz, 2006).

2.4 Grupos experimentais

As cadelas com LV foram divididas em dois grupos, de acordo com a dosagem dos níveis séricos de progesterona e com os achados da citologia vaginal, sendo estro e diestro (G1, níveis altos de progesterona, n=9) e anestro e proestro (G2, níveis baixos de progesterona, n=11), segundo descrito por Pires e Carreira (2015).

Todos os animais foram submetidos à eutanásia com overdose intravenosa de barbitúrico, seguida da administração de cloreto de potássio, conforme a Portaria interministerial nº 1.426/2008, do Ministério da Saúde do Brasil e a Resolução nº 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Brasil, 2008, CFMV, 2012). Em seguida, foi realizado o exame necroscópico desses animais, no qual foram coletadas amostras de tecido da mama inguinal direita, para as análises histopatológica e imunohistoquímica. A mama inguinal foi selecionada por receber maior influência hormonal, pois juntamente com a mama abdominal caudal possui maior volume de tecido glandular (Feliciano et al., 2012).

2.5 Avaliação Histopatológica

Os fragmentos de mama foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (0,15 Molar) pH 7,2, durante 48 horas. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em soluções de concentração crescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina de acordo com a técnica histológica de rotina. Os blocos foram cortados na espessura de 5µm e corados com hematoxilina e eosina (HE) (Tolosa et al., 2003). As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz e as alterações histopatológicas da mama, inflamatórias ou displásicas, foram avaliadas em escores: ausente (-), discreto (+), moderado (++), acentuado (+++).

2.6 Avaliação Imunohistoquímica

Na técnica de imunohistoquímica, a identificação de formas amastigotas de *Leishmania* sp. foi feita com soro hiperimune de cão positivo para LV (modificado de Tafuri et al., 2004). A mesma técnica foi utilizada para identificar macrófagos (MCA 874, AbD Serotec, cód. 1209), linfócitos T (CD3, Dako, cód. A0452), linfócitos TCD4 (AbD Serotec, cód. MCA1999S) e linfócitos TCD8 (AbD Serotec, MCA1999S).

Os protocolos de imunohistoquímica para os diferentes anticorpos foram constituídos por desparafinização das lâminas em estufa (60°C), por uma hora, seguida da imersão dos cortes em xilol (20 minutos). Após, os cortes foram hidratados em soluções de concentrações decrescentes de álcool até a lavagem em água destilada. A recuperação antigênica foi feita pelo calor (tabela 1). No bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se produto comercial (Hydrogen Peroxide Block, Spring, cód. DHP125) / 30 minutos ou a solução de metanol e água oxigenada a 8% / 30 min, protegido da luz, à temperatura ambiente. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi duplo, primeiro com produto comercial (Protein Block, Dako, cód. X0909) / 1 hora, seguido de incubação com solução de leite em pó desnatado (Molico®), diluído em água destilada a 8% / 1 hora. A incubação dos cortes em ambas as soluções foi feita em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente. O cromógeno utilizado foi diaminobenzidina (3,3-diaminobenzidina, Dako, cód. K3468-1), por 3 minutos. Na contra-coloração utilizou-se hematoxilina de Harris, por 3 minutos. Entre cada passo foram realizadas lavagens dos cortes com solução tampão de TRIS HCl (pH 7,4) / 5 minutos e com água destilada / 5 minutos.

Os controles positivos foram feitos com os tecidos sugeridos pelo fabricante de cada anticorpo. No controle negativo da reação imunohistoquímica utilizou-se diluente

de anticorpo (Antibody diluent with background reducing components, Dako, cod. S3022), em substituição ao anticorpo primário.

A densidade das células imunomarcadas para cada anticorpo foi determinada pela contagem das células nas áreas da mama que apresentaram maior imunomarcacão (*hot spot*), em dez campos de grande aumento (obj. 40x, área=0,19625 μm^2), segundo descrito por Moreira et al. (2010), em microscópio de luz (Nikon, modelo E200). As imagens capturadas foram analisadas pelo software Cell Sens Standards Olympus Corporation (versão 1.9, 2009-2013).

Tabela 1. Protocolo dos anticorpos utilizados na análise imunohistoquímica do trato reprodutor de cadelas com Leishmaniose Visceral.

Anticorpo primário	Recuperação antigênica	Diluição	Incubação/ temperatura	Conjugado	Bloqueio peroxidase
Leishmania	Câmara de pressão Pascal (Dako), Citrato ¹	1:500	2h/ temp. ambiente	Advance ³	M+P ⁶
MCA 874 (macrófago)	Câmara de pressão Pascal (Dako), Citrato ¹	1:4000	18h/4°C	EnVision ⁴	M+P ⁶
CD3 (linfócito T)	Câmara de pressão Pascal (Dako), Citrato ¹	1:350	2h/ temp. ambiente	EnVision ⁴	M+P ⁶
CD4 (linfócito T)	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ²	1:150	18h/4°C	HRP(Spring) ⁵	HPB ⁷
CD8 (linfócito T)	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ²	1:150	18h/4°C	HRP(Spring) ⁵	HPB ⁷

1- Tampão para recuperação antigênica (pH 6,0); 2- Tampão para recuperação antigênica (pH 9,0); 3- Complexo de polímeros ligados à peroxidase (Kit Advance HRP, Dako, cód. K4068); 4- Complexo de polímeros ligados à peroxidase (Kit EnVision Flex HRP, Dako, cód. K8000); 5- Complexo de polímeros ligados a peroxidase (Kit HRP, Spring, cód. DHP125); 6- Metanol + peróxido de hidrogênio, 8%, com incubação antes do anticorpo primário; 7- Bloqueio da peroxidase endógena (Spring, cód. DHP125) com incubação depois do anticorpo primário.

2.7 Análise estatística

A análise estatística univariada foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 5. Inicialmente foi testada a normalidade dos resíduos (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade das variâncias (teste F de comparação de variância) de todos os parâmetros estudados. Naqueles que apresentaram distribuição normal, as médias entre os grupos foram comparadas pelo teste T não pareado. Enquanto a média dos valores que apresentaram distribuição não Gauseana foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Ademais, realizou-se teste de correlação de Spearman entre os valores de carga parasitária e as alterações encontradas na histologia do tecido mamário (HE), e também entre a carga parasitária e as variáveis da imunohistoquímica. A significância foi fixada para todos os testes em 5% ($p < 0,05$).

A análise estatística multivariada e análises complementares foram realizadas no Software R (versão 3.6.3). Os parâmetros carga parasitária, MCA874, CD3, CD4, CD8 e dosagem de progesterona foram avaliados entre os grupos 1 e 2, por meio do teste de Mann Whitney não pareado. Adicionalmente fez-se uma análise de componentes principais utilizando o FactoMineR package no R. Os valores resultantes de cada variável apresentam-se como a mediana $\pm$ a faixa interquartil (IQR) e a significância foi declarada a $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

Na avaliação histopatológica do tecido mamário de todos os animais foi observada a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, que foi constituído por plasmócitos, linfócitos e macrófagos, por vezes parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* spp. A inflamação foi observada no ambiente intralobular (Figura 1A), ao redor de ductos e também na derme superficial da pele adjacente à mama. A

intensidade de inflamação variou de discreta a acentuada, mas também foram observados leucócitos no tecido conjuntivo interlobular e no lúmen de ductos (Figura 1B).

Especificamente, no tecido mamário (tabela 2) observou-se hipertrofia das células mioepiteliais, que apresentaram um aspecto globoso e citoplasma não corado. Elas estavam presentes entre o epitélio acinar e a membrana basal e por vezes empurravam as células epiteliais para o centro do ácino (Figura 1C). Hiperplasia sem atipia de células epiteliais de ácinos e ductos, fibrose intra e interlobular (Figura 1D) e ectasia ductal foram outras alterações da mama. A variação das alterações histopatológicas no tecido mamário de cadelas com Leishmaniose Visceral pode ser visualizada na tabela 2.

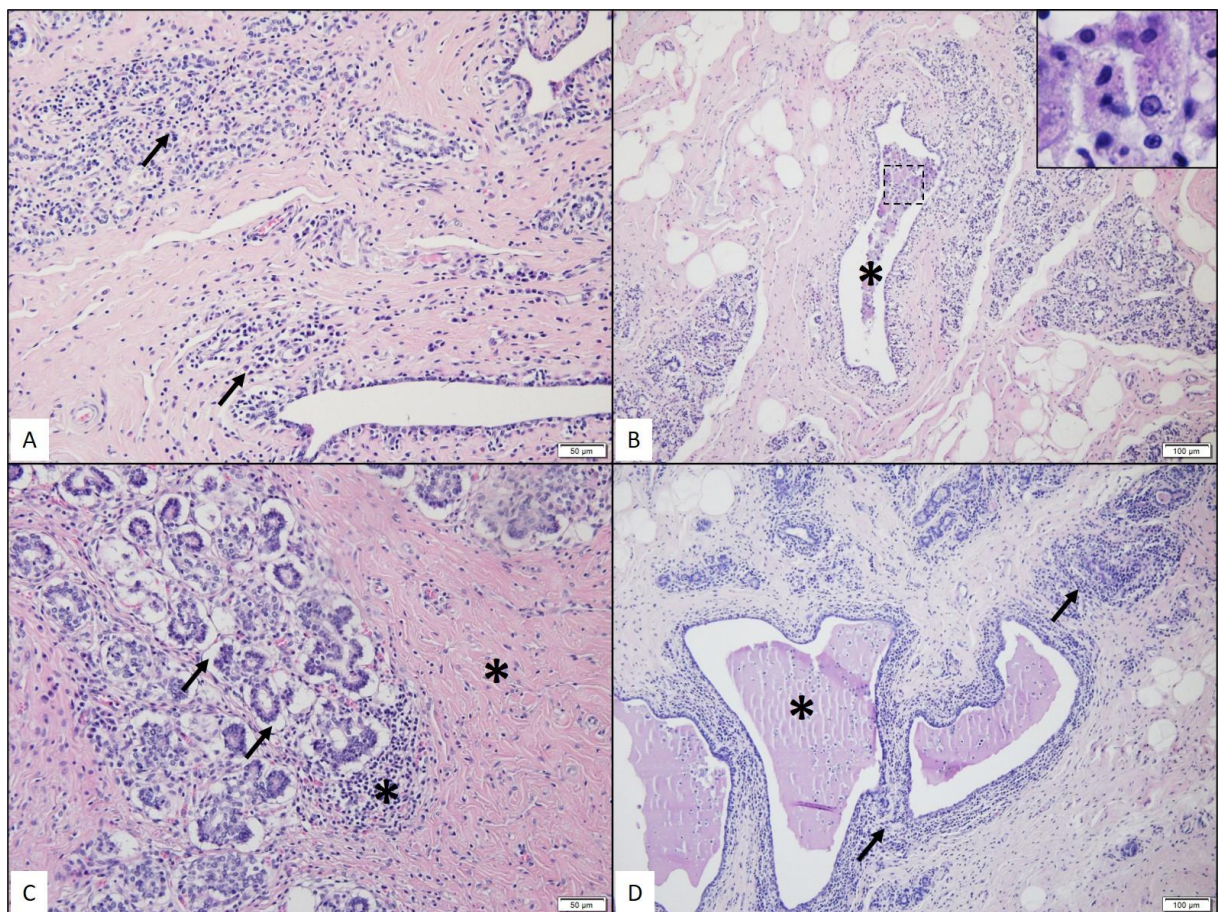


Figura 1. Fotomicrografias das alterações histopatológicas observadas no tecido mamário de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) Infiltrado inflamatório mononuclear na região intralobular e periductal

(setas) (Barra = 50µm). B) Infiltrado inflamatório mononuclear periductal e leucócito intraluminal (asterisco) e macrófagos com formas amastigotas no citoplasma de macrófagos (detalhe) (Barra = 100µm). C) Infiltrado inflamatório intralobular e fibrose interlobular (asteriscos) e hipertrofia de célula mioepitelial (setas) (Barra = 50 µm). D) Infiltrado inflamatório intralobular e periductal (setas) e ectasia ductal (asterisco) (Barra = 100µm). Hematoxilina-eosina.

Tabela 2. Lesões na mama, carga parasitária e níveis de progesterona em cadelas com Leishmaniose Visceral.

Grupos	Cadela	Dosagem progesterona (ng/mL)	iiLPiL	HMep	HSA	Fib	ED	CP*
Grupo G1 (Fase de progesterona alta)	1	31,30	+	+	+	+	-	54,5
	2	8,30	+++	+++	++	+++	-	3,2
	3	4,97	+++	++	++	++	-	6,5
	4	2,46	+++	++	+++	++	-	7,5
	5	NA	+++	++	+	++	++	11,8
	6	5,70	++	+	+	+	-	61,8
	7	4,10	++	+++	++	++	+	0
	8	2,90	+	-	-	-	-	3,1
	9	NA	+	++	+	+	-	18,3
Grupo G2 (Fase de progesterona baixa)	10	0,80	+++	++	++	++	++	0
	11	0,30	+	-	-	-	-	0
	12	0,48	++	+	-	+	-	21,5
	13	0,82	++	-	+	++	+	31,4
	14	0,30	+++	++	++	+++	++	2,3
	15	0,79	+	-	-	+	+	0
	16	0,37	+	-	-	-	-	0
	17	0,27	+	-	+	+	-	2,6
	18	0,32	+	-	-	-	-	0
	19	0,2	+	-	-	-	-	7,6
	20	NA	+	++	-	+	-	0
Valor de P	-	-	0,1719	0,0218	0,0334	0,1932	0,5408	0,0213

ng/mL (Nanograma por mililitro); iiLPiL (Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intra-lobular); HMep (Hipertrofia de células mioepiteliais); HSA (Hiperplasia sem atipia do epitélio acinar e ductal); Fib (Fibrose interlobular); ED (Ectasia ductal); CP* (Carga parasitária, média de macrófagos parasitados); Dosagem hormonal (níveis séricos individuais de progesterona; (-) Ausente; (+) Discreto; (++) Moderado; (+++) Acentuado. Valor de P na comparação entre os grupos 1 e 2 (Teste de Mann-Whitney).

O infiltrado inflamatório mononuclear intralobular e periductal foi observado no tecido mamário de todas as 20 cadelas, independentemente do grupo. A hipertrofia de células mioepiteliais e a hiperplasia sem atipia de células epiteliais de ácinos e ductos foram observadas em 12 cadelas (60%) para cada alteração. A fibrose foi observada no ambiente intralobular e interlobular, acometendo 15 animais (75%) e a ectasia ductal foi observada em seis animais (30%).

Na comparação entre os resultados das alterações histopatológicas nos grupos houve diferença significativa para hipertrofia das células mioepiteliais ($p=0,0218$) e hiperplasia sem atipia de células epiteliais de ácinos e ductos ($p=0,0334$, teste Mann Whitney). Não houve diferença entre os grupos para inflamação, fibrose e ectasia ductal ($p<0,05$), bem como, não houve correlação significativa entre a carga parasitária e nenhuma das alterações histopatológicas observadas.

Na análise imunohistoquímica da glândula mamária verificou-se que 12 (60%) animais apresentaram macrófagos positivos para *Leishmania* spp. Destes, oito eram do grupo G1(66,6%) e quatro do grupo G2 (33,3%). A presença de formas amastigotas foi observada no citoplasma de macrófagos localizados nas regiões intralobular, periductal e também no interior de lúmen de ductos mamários. No infiltrado inflamatório intralobular e periductal (Figura 2) foi visualizada a imunomarcagem de linfócitos T auxiliares (CD4), macrófagos (MCA874), de linfócitos T (CD3) e de linfócitos T citotóxicos (CD8). Os linfócitos TCD8 também foram observados entremeados às células epiteliais da mama.

Na análise das variáveis da imunohistoquímica observou-se que a média de células imunomarcadas para cada anticorpo foi maior nos animais do grupo G1, com diferença significativa entre os grupos ($P<0,05$) para todas elas (Figura 3). Na

avaliação da correlação entre a carga parasitária e as variáveis da imunohistoquímica (Figura 4) houve correlação positiva com CD3 ($r = 0,76$; $p < 0,0001$), CD4 ($r = 0,76$; $p < 0,0001$), CD8 ($r = 0,46$; $p = 0,038$) e MCA874 ($r = 0,55$; $p = 0,011$).

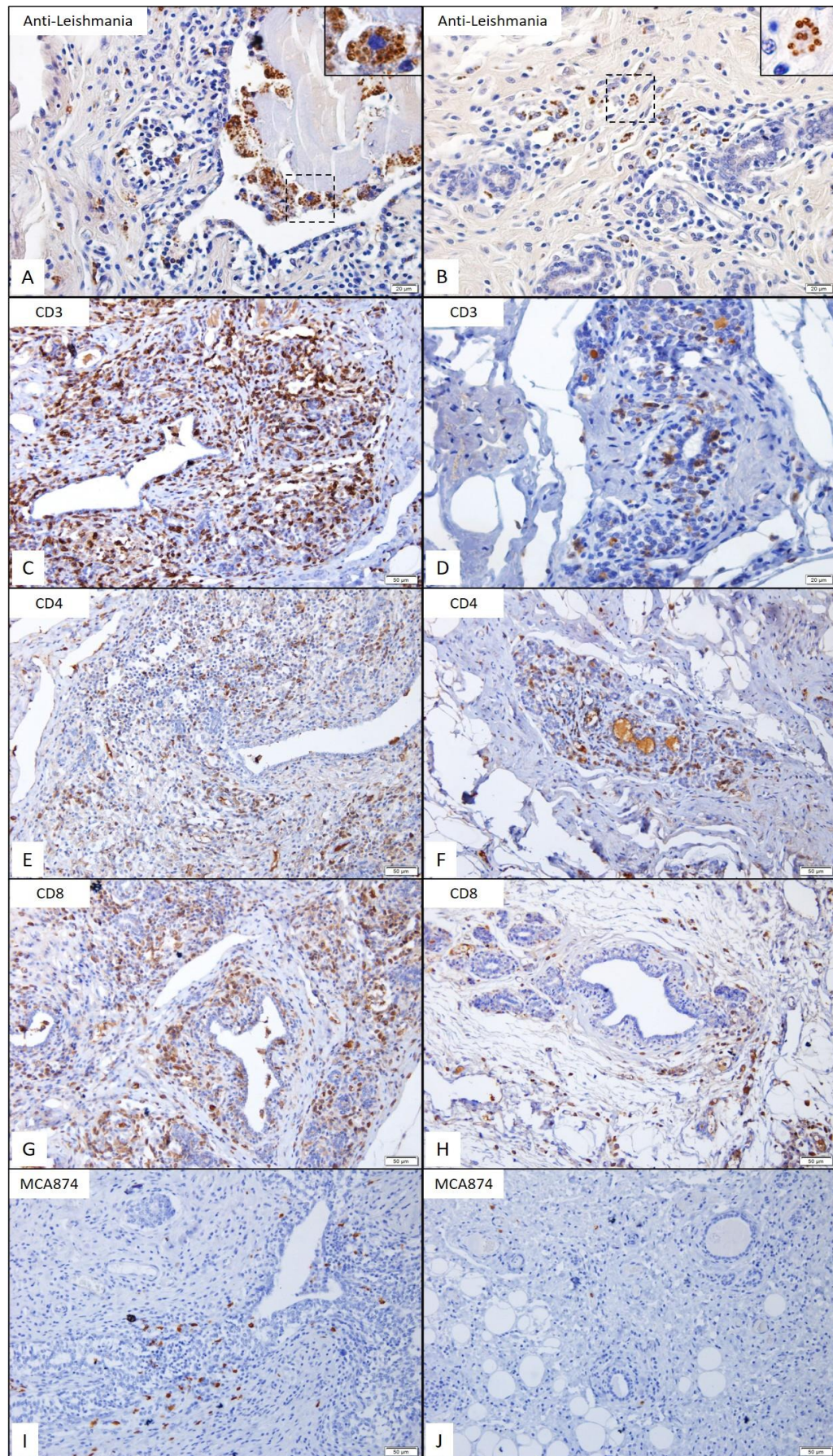


Figura 2. Fotomicrografias da imunomarcação dos leucócitos presentes nas mamas de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) No grupo G1 nota-se amastigotas de *Leishmania* spp. no citoplasma de macrófagos da região periductal e no lúmen do ducto (detalhe) (Barra = 20µm). B) Parasitas observados ao redor do ducto no grupo G2 (Barra = 20µm). C-D) Linfócitos periductais TCD3 positivos nos grupos G1 e G2 respectivamente (Barra = 50µm). E-F) Linfócitos TCD4 presentes na inflamação periductal de G1 e intralobular de G2 respectivamente (Barra = 50µm). G-H) Linfócitos TCD8 em linfócitos presentes ao redor de ductos (G1) e na região intratubular (G2) (Barra = 50µm). I-J) Macrófagos (MCA874) presentes na região intralobular (G1 e G2 respectivamente) (Barra = 50µm). Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Grupo G1 (Níveis altos de progesterona); Grupo G2 (Níveis baixos de progesterona).

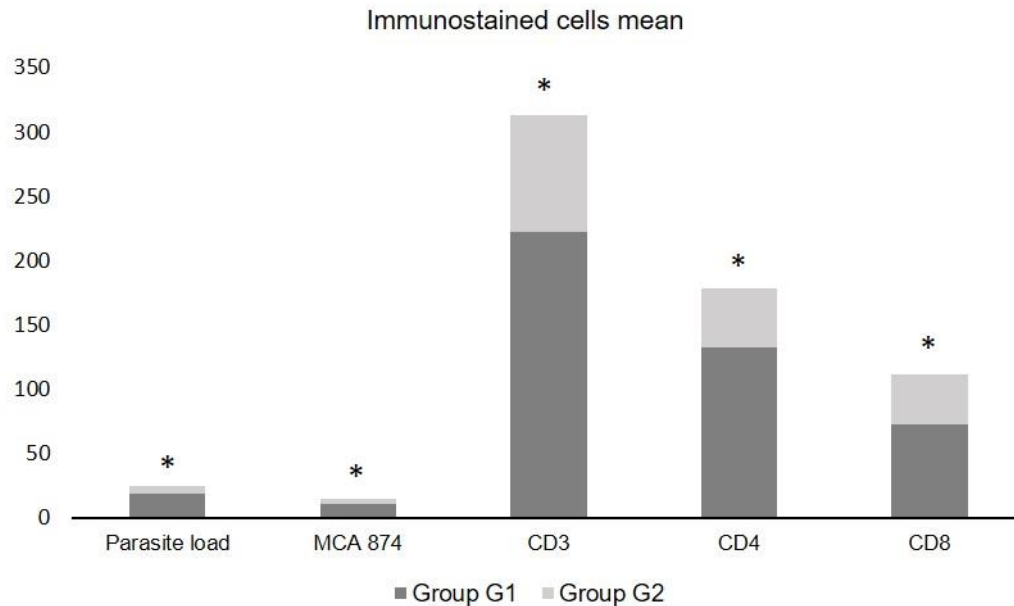


Figura 3. Comparação das médias de células imunomarcadas entre os grupos G1 e G2, com diferença significativa entre os grupos (*) para carga parasitária ($p=0,0213$, Teste de Mann-Whitney), macrófagos (MCA874, $p=0,0020$, teste T não pareado), linfócitos TCD3 ($p=0,0018$, teste T não pareado), linfócitos TCD4 ($p=0,0024$, Teste Mann-Whitney) e linfócitos TCD8 ($p=0,0335$, teste T não pareado). Grupo G1 (Níveis altos de progesterona); Grupo G2 (Níveis baixos de progesterona).

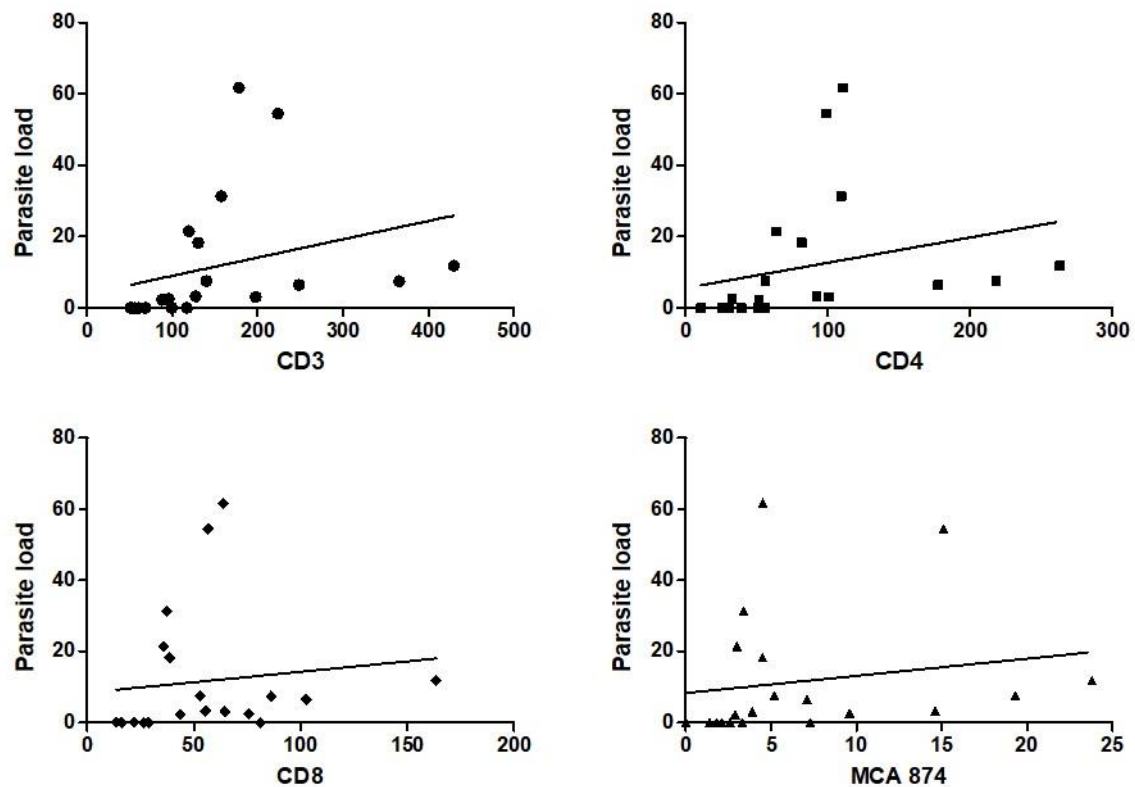


Figura 4. Análise de correlação de Spearman entre as médias de carga parasitária (CP) e as variáveis da imuno-histoquímica ($p < 0,05$). Notar que houve correlação positiva entre CP e CD3 ($r = 0,76$; $p < 0,0001$), CD4 ($r = 0,76$; $p < 0,0001$), CD8 ($r = 0,46$; $p = 0,038$) e MCA874 ($r = 0,55$; $p = 0,011$). CD3 (linfócitos T CD3); CD4 (Linfócitos T CD4); CD8 (Linfócitos T CD8); MCA874 (Macrófagos).

Os grupos 1 e 2 apresentaram valores estatisticamente similares de carga parasitária ($P > 0,05$; Tabela 3), porém no grupo 1 os valores médios de carga parasitária foram maiores, bem como de macrófagos (MCA874), subtipos de linfócitos T (CD3, CD4, CD8) e da dosagem de progesterona ($P < 0,05$).

Tabela 3. Mediana $\pm$ faixa interquartil das variáveis mensuradas no sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral.

	Grupo 1	Grupo 2	p-valor
Carga parasitária	7,5 $\pm$ 15,1	0,0 $\pm$ 5,1	0,052
MCA874	7,3 $\pm$ 10,6 ^a	2,9 $\pm$ 1,4 ^b	0,001
CD3	197,4 $\pm$ 118,0 ^a	87,9 $\pm$ 59,95 ^b	0,001
CD4	100,7 $\pm$ 85,3 ^a	39,2 $\pm$ 27,35 ^b	0,002
CD8	63,7 $\pm$ 30,7 ^a	35,8 $\pm$ 26,95 ^b	0,025
Progesterona	4,70 $\pm$ 1,94 ^a	0,32 $\pm$ 0,35 ^b	0,003

Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam significância pelo teste de Mann-Whitney não pareado ($p \leq 0,05$). MCA874 (macrófagos); subtipos de linfócitos T (CD3, CD4, CD8).

A análise de componentes principais (PCA; Figura 5) resultou na separação dos grupos 1 e 2, sendo explicada 85,9% da sua variação pelas variáveis utilizadas. Os animais do grupo 2 foram distribuídos exclusivamente na região negativa do componente 1 (Dim1), enquanto animais do grupo 1 localizaram-se principalmente na região positiva do componente 1. Assim, o grupo 1 foi correlacionado positivamente com MCA874 ($r=0,90$), CD3 ($r=0,97$), CD4 ($r=0,94$) e CD8 ($r=0,87$). Enquanto ambos os grupos foram associados positivamente à carga parasitária ($r=0,80$) e dosagem de progesterona ($r=0,75$).

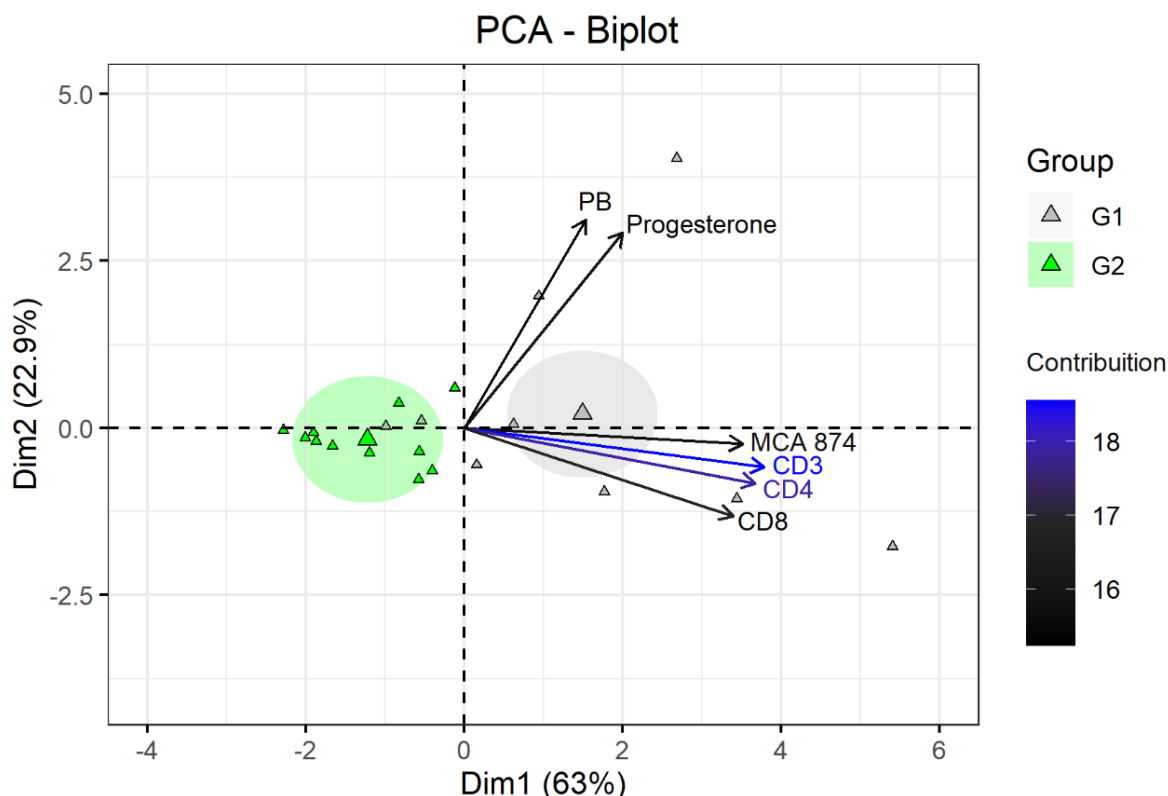


Figura 5. Análise de componentes principais (PCA) das medidas de animais do grupo 1 (altos níveis de progesterona) e grupo 2 (baixos níveis de progesterona). Variáveis com maior contribuição apresentam-se coloridas em azul. Triângulos maiores no centro das elipses representam a média dos animais em cada grupo. PB = carga parasitária; MCA874 (macrófagos); subtipos de linfócitos T (CD3, CD4, CD8).

4. DISCUSSÃO

As lesões das células epiteliais e mioepiteliais da mama foram mais evidentes no grupo G1, mostrando uma forte influência hormonal, que pode ter sido potencializada pelo processo inflamatório crônico e persistente da mama induzido pelo parasita e/ou pela própria progesterona (Solano-Gallego et al., 2011; Zachary e McGavin, 2016; Cassali et al., 2017). Na mama de mulheres, ao longo do ciclo menstrual, a proliferação das células epiteliais está positivamente associada à concentração sérica de progesterona, que depois regride durante a fase folicular (Fata et al., 2001; Navarrete et al., 2005). Nas cadelas com pseudociese ou em condições normais do ciclo reprodutivo, a proliferação do tecido mamário, associada ou não à

lactação, foi descrita em 78,6% das cadelas, devido à influência da progesterona (Beaver, 2009).

A fibrose interlobular da mama não diferiu estatisticamente entre os grupos G1 e G2, mas teve maior intensidade no grupo G1. Goldschmidt et al. (2011) descrevem alterações hiperplásicas e displásicas na mama de cadelas, dentre elas a hiperplasia lobular com fibrose interlobular. Os hormônios, particularmente a progesterona, podem induzir o desenvolvimento de lesões fibromatosas na mama de animais. A remoção do estímulo hormonal pode induzir a regressão da fibroplasia (Ordás et al., 2004). Portanto, no presente estudo, a fibrose interlobular possivelmente decorreu de um estímulo hormonal. Porém no presente estudo, no mesmo grupo também foi observada maior intensidade de inflamação e de macrófagos parasitados na mama.

Os mediadores inflamatórios liberados localmente também podem ter potencializado a fibroplasia mamária, pois na inflamação crônica, os elevados níveis de TGF- β e PDGF liberados por macrófagos resultam na reparação do tecido (Guyot et al., 2006, Zachary e McGavin, 2016). Em estudos anteriores foi relatado que a fibrogênese hepática estava relacionada a maior carga parasitária em cães sintomáticos (Melo et al., 2009, Marques et al., 2018). Em nosso estudo não foi observada correlação significativa entre a carga parasitária e as alterações histopatológicas (hiperplasia epitelial, fibrose) observadas na glândula mamária dos animais, o que reforça a influência hormonal nesta alteração.

Cadelas com LV apresentaram inflamação crônica do tecido mamário, muitas vezes associada a formação de granulomas parasitados ou não, similar a estudo anterior (Boechat et al., 2016). No presente estudo, também se observou maior

intensidade de inflamação e carga parasitária no grupo G1, o que mostra influência da progesterona.

Boechat et al. (2016) observaram, por imunohistoquímica, que 65% das cadelas estudadas tiveram imunomarcagem positiva para *L. infantum* em macrófagos da inflamação granulomatosa intralobular e no interior de ductos mamários. No presente estudo os resultados foram similares, pois 60% das cadelas tiveram o parasita associado ao infiltrado inflamatório dos ambientes intralobular, periductal e intraluminal em ductos mamários, mostrando a sua eliminação pelo leite, similar a outros estudos (Boechat et al., 2016). A presença de *Leishmania infantum* identificada na secreção mamária de uma cadela prenhe (citologia, imunohistoquímica e PCR), confirma essa via de eliminação do parasita (Metzdorf et al., 2014). Estudo com modelos murinos observou a migração leucocitária intraluminal em camundongos lactentes, em condições fisiológicas (Seelig e Beer, 1978). Portanto, fica claro que a migração leucocitária ocorre pelo leite, possivelmente com função imune para os filhotes das fêmeas lactentes. A partir daí, se *Leishmania* sp., em sua forma amastigota intracelular, terá a capacidade de infectar os filhotes lactentes é um fato a ser investigado.

No presente estudo, o perfil leucocitário do infiltrado inflamatório mamário foi significativamente maior no grupo G1. Em estudos com modelos murinos observou-se que a progesterona possui um papel imunossupressor, induzindo uma resposta inflamatória predominante com perfil Th2 e consequente inibição da Th1, devido a elevada liberação de IL-10 (Faas et al., 2000, Miyaura e Iwata, 2002). O mesmo tipo de resposta, com expressão elevada de IL-4, IL-10 e TGF- β e associada a elevada carga parasitária foi descrita na pele de cães com LV (Papadogiannakis e Koutinas,

2015). A ação imunossupressora da progesterona pode ter favorecido a maior carga parasitária e perfil celular de G1, pois este tipo de resposta permite a progressão e persistência da doença no hospedeiro (Hailu et al., 2005; Barbiéri, 2006).

A localização dos leucócitos imunomarcados nas cadelas com LV deste estudo foi sempre associada ao ambiente intralobular, mostrando uma íntima relação destas células com o epitélio da mama. Na mama de mulheres sem tumor, a localização de células imunes foi similar, ou seja, associada aos lóbulos. Ainda, verificou-se que a população predominante neste local foi de linfócitos T citotóxicos, macrófagos e células dendríticas. Os linfócitos T auxiliares e os linfócitos B eram praticamente ausentes (Degnim et al., 2014).

Nas cadelas com LV, a maior proporção celular na mama foi dos subtipos de linfócitos T (CD3, CD4, CD8), com correlação positiva com a carga parasitária no grupo G1. Segundo a análise de componentes principais, as variáveis CD3 e CD4 foram as que mais contribuíram para explicar os resultados entre os grupos G1 e G2. A influência imunossupressora da progesterona possivelmente modulou o fenótipo destas subpopulações de leucócitos (Miyaura e Iwata, 2002). O fenótipo CD3 é expresso em várias subpopulações de linfócitos T em resposta ao antígeno, tais como, os linfócitos $T\gamma\delta$ da imunidade inata (Borska et al., 2009). A maior densidade de células marcadas na mama das cadelas com LV foi de linfócitos CD3+. Os linfócitos $T\gamma\delta$ expressam, dentre outros marcadores o CD3 e geralmente estão envolvidos na proteção das mucosas, pois aparecem associados ao epitélio (Pereira et al., 2019), aspecto também observado nas cadelas com LV.

Os linfócitos $T\alpha\beta$, dependendo do antígeno, podem se diferenciar em TCD4 e TCD8, resultando em resposta imune humoral ou celular dependente da ligação com

o MHC (Pereira et al., 2019). O fenótipo CD4 pode estar aumentado em processos inflamatórios na mama (Degnim et al., 2014). Nas cadelas com LV do grupo G1, o número de linfócitos TCD4 foi maior que os linfócitos TCD8. Em estudo com carcinomas mamários caninos, a predominância de linfócitos T CD4 foi associada ao pior prognóstico pela presença de metástase e menor taxa de sobrevivência. O contrário foi observado para os linfócitos T CD8 (Estrela- Lima et al., 2010). Na LV canina, a presença de linfócitos T regulatórios (CD4+) foi associada à persistência da infecção, por contribuírem com a imunossupressão pela produção de IL-10 e TG- β (Silva et al., 2014). Talvez parte dos linfócitos T CD4 presentes na mama das cadelas sejam linfócitos T regulatórios, que criam um ambiente pouco favorável para a ativação dos linfócitos TCD8.

Os linfócitos T CD8 foram frequentemente observados entremeados ao epitélio mamário no presente estudo, similar ao descrito na literatura (Tanneau et al., 1999). Degnim et al. (2014) sugeriram que estas células podem contribuir com a integridade epitelial. Correlação significativa foi observada entre os linfócitos T CD8 e a carga parasitária em G1. O fato de aumentar o número de linfócitos T CD8 na medida que aumenta a carga parasitária, não garante a ativação da imunidade celular citotóxica. Kemp et al. (2005) descreveram que os linfócitos T CD8 podem apresentar duas subpopulações (tipo 1 e 2). As células T CD8 (tipo 1) secretam citocinas Th1 (INF- γ) e as do tipo 2 secretam citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10). Considerando que o grupo G1 de cadelas com LV apresentou maior marcação de CD8, sugere-se que o fenótipo do microambiente mamário possivelmente seria do tipo 2, com provável função na manutenção da homeostase do epitélio mamário, com consequente contribuição para a persistência da infecção.

A resposta imune ao parasita é crítica para o resultado da infecção e a resposta ao tratamento e a determinação das populações de linfócitos T CD4 e CD8 no sangue periférico por citometria de fluxo parece ser um rápido método para avaliar a resposta imune e que em cães saudáveis a razão CD4/CD8 é maior que um (Papadogiannakis et al., 2010). Ainda de acordo com esses autores cães infectados por *L. infantum* apresentam redução de linfócitos T CD4 com uma redução da razão CD4/CD8. De acordo com Foster (2016), os linfócitos T CD8 estão em maioria na glândula mamária normal e por isso a razão CD4/CD8 no tecido mamário seria menor que um, o inverso da razão encontrada no sangue. No nosso estudo observamos que a média de linfócitos CD4 na mama foi maior que a média de linfócitos CD8 o que daria uma razão CD4/CD8 >1.

Os macrófagos, embora em menor densidade, também predominaram nos animais do grupo G1. Em modelos murinos relata-se que a abundância de macrófagos na glândula mamária sofre influência do ciclo estral, com um pico nas fases de maior concentração da progesterona (Chua et al., 2010). Adicionalmente, Hodson et al. (2013) observaram na mesma espécie, que os hormônios ovarianos regulam o fenótipo de macrófagos na glândula mamária e que a progesterona pode diminuir a apresentação antigênica e a capacidade de vigilância imunológica do macrófago, limitando a sua função de estimular a resposta imune adaptativa contra patógenos.

Considerando os aspectos discutidos pode-se inferir que a progesterona possivelmente favorece a permanência da *L. infantum* no tecido mamário, influenciando negativamente na ativação e eficiência funcional dos leucócitos infiltrados neste local a controlar a infecção pelo parasita.

5. CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo foi possível concluir que:

- Cadelas com maiores níveis de progesterona tiveram maior intensidade de inflamação, macrófagos parasitados e alterações hiperplásicas/ displásicas na mama.
- Os subtipos de linfócitos (CD3, CD4 e CD8) e os macrófagos (MCA874) predominaram no mesmo grupo (G1), mostrando que a influência hormonal do ciclo estral sobre a mama modulou fenótipo destes leucócitos para um fenótipo pouco protetor, contribuindo para a persistência da infecção no tecido mamário.

Cumprimento aos padrões éticos: O presente estudo com os animais foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (CEUA-UNESP), Câmpus de Jaboticabal, sob nº Protocolo 009028/17.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro. Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (São Paulo, Brasil) por disponibilizar os animais deste estudo e pela colaboração dos funcionários do setor. Ao Setor de Patologia Veterinária, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP/FMVA), por disponibilizar as instalações para a realização do exame necroscópico das cadelas.

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

REFERÊNCIAS

- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis, part one. *Trends Parasitol.* 24, 324-330.
- Barbiéri, C.L., 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 28, 329-337.
- Barata, R.A., Silva, J.C.F., Costa, R.T., Dias, C.L.F., Silva, J.C., Paula, E.V., Prata, A., Monteiro, E.M., Dias, E.S., 2004. Phlebotomine Sand Flies in Porteirinha, an Area of American Visceral Leishmaniasis Transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99, 481-487.
- Beaver, B.V., 2009. Female canine sexual behavior. In: Beaver, B.V. (Eds.), *Canine Behavior*, 2nd ed. Elsevier, St. Louis, pp. 205-222.
- Betts, C.B., Pennock, N.D., Caruso, B.P., Ruffell, B., Borges, V.F., Schedin, P., 2018. Mucosal immunity in the female murine mammary gland. *J Immunol.* 201, 734–746.
- Boechat, V.C., Mendes Junior, A.A.V., Madeira, M.F., Ferreira, L.C., Figueiredo, F.B., Rodrigues, F.C.C., Oliveira, V.C., Oliveira, R.V.C., Menezes, R.C., 2016. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitol Res.* 115, 2371-2379.
- Borska, P., Faldyna, M., Blatny, J., Leva, L., Vejrostova, M., Doubek, J., Moore, P.F., 2009. Gamma/delta T-cell lymphoma in a dog. *Can Vet J.* 50, 411–416.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008 – Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso

humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ministério da Saúde, Brasília, 2008. 2 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. Ed. 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.

Campino, L., Maia, C., 2018. The role of reservoirs: canine leishmaniasis. In: Ponte-Sucre, A., Padrón-Nieves, M. (Eds.), *Drug Resistance in Leishmania Parasites – Consequences, Molecular Mechanism and Possible Treatments*, 2nd Ed. Springer, Vienna, pp. 59–83.

Cassali, G.D., Ferreira, E., Campos, C.B. (Ed.), 2017. *Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento*. Medvet, São Paulo, 224pp.

Chua, A.C., Hodson, L.J., Moldenhauer, L.M., Robertson S.A., Ingman, W.V., 2010. Dual roles for macrophages in ovarian cycle-associated development and remodelling of the mammary gland epithelium. *Development*. 137, 4229–4238.

Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012 – Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Conselho Federal de Medicina Veterinária, Brasília, 2012. 9 p.

Coussens, L.M., Pollard, J.W., 2011. Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3, 1-22.

Daher, S., Mattar, R., 2009. Gestação: um fenômeno imunológico? *Rev Bras Alergia Imunopatol*. 32, 63-67.

Dos Santos, D.S., Albuquerque, J.B., Guerra, B., Moreira, O.C., Berbert, L.R., Ramos, M.T., Mascarenhas, B.A.S, Britto, C., Morrot, A., Villa-Verde, D.M.S., Garzoni,

L.R., Savino, W., Almeida, V.C., Meis, J., 2017. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl Trop Dis*. 11, 1-26.

Degnim, A.C., Brahmbhatt, R.D., Radisky, D.C., Hoskin, T.L., Stallings-Mann, M., Laudenschlager, M., Mansfield, A., Frost, M.H., Murphy, L., Knutson, K., Visscher, D.W., 2014. Immune cell quantitation in normal breast tissue lobules with and without lobulitis. *Breast Cancer Res Treat*. 144, 539–549.

Estrela-Lima, A., Araújo, M.S.S., Costa-Neto, J.M., Teixeira-Carvalho, A., Melo, S.M.B., Cardoso, S.V., Martins-Filho, O.A., Serakides, R., Cassali, G.D., 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*. 256, 2-14.

Faas, M., Bouman, A., Moesa, H., Heineman, M.J., De Leij, L., Schuiling, G., 2000. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? *Fertil Steril*. 74, 1008–1013.

Fata, J.E., Chaudhary, V., Khokha, R., 2001. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17 β -estradiol during the estrous cycle. *Biol Reprod*. 65, 680–688.

Feliciano, M.A.R., João, C.F., Cardilli, D.J., Crivelaro, R.M., Vicente, W.R.R., 2012. Neoplasia mamária em cadelas – Revisão de Literatura. *Rev Cient Eletrônica Med Vet*. 18, 1-12.

Foster, R.A., 2016. Female reproductive system and mammae. In: Zachary, J.F., McGavin, M.D. (Eds.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6th edn. Elsevier, St Louis, pp 1085-1126.

Guyot, C., Lepreux, S., Combe, C., Doudnikoff, E., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Desmoulière, A., 2006. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol.* 38, 135–151.

Hailu, A., Baarle, D., Knol, G.J., Berhe, N., Miedema, F., Kager, P.A., 2005. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and symptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clin Immunol.* 117, 182-191.

Herath, S., Dobson, H., Bryant, C.E., Sheldon, I.M., 2006. Use of the cow as large animal model of uterine infection and immunity. *J Reprod Immunol.* 69, 13-22.

Hodson, L.J., Chua, A.C., Evdokiou, A., Robertson, S.A., Ingman, W.V., 2013. Macrophage phenotype in the mammary gland fluctuates over the course of the estrous cycle and is regulated by ovarian steroid hormones. *Biol Reprod.* 89, 65.

Kemp, R.A., Bäckström, B.T., Ronchese, F., 2005. The phenotype of type 1 and type 2 CD8⁺ T cells activated in vitro is affected by culture conditions and correlates with effector activity. *Immunol.* 115, 315-324.

Maimela, N.R., Liu, S., Zhang, Y., 2019. Fates of CD8⁺ T cells in tumor microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J.* 17, 1–13.

Marques, N.C., Moreira, P.M.R., Bertolo, P.H.L., Gava, F.N., Vasconcelos, R.O., 2018. Immunodetection of hepatic stellate cells in dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 117, 1829-1837.

Melo, F.A., Moura, E.P., Ribeiro, R.R., Alves, C.F., Caliari, M.V., Tafuri, W.L., Calabrese, K.S., Tafuri, W.L., 2009. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Int J Exp Path* 90:538–548.

Metzdorf, I.P., Moura, F.S.V., Franco, P.A., Correia, E.L., Lima Junior, M.S.C., Matos, M.F.C., Borges, F.A., 2014. Primeira identificação de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em secreção mamária canina. In: Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil

Miyaura, H., Iwata, M., 2002. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol.* 168, 1087–1094.

Moreira, P.R., Vieira, L.M., Andrade, M.M., Bandarra, M.B., Machado, G.F., Munari, D.P., Vasconcelos, R.O., 2010. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 107, 605-613.

Moreiraa, P.R.R., Fernando, F.S., Montassier, H.J., André, M.R., Vasconcelos, R.O., 2016. Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 226, 69-73.

Navarrete, M.A.H., Maier, C.M., Falzoni, R., Quadros, L.G.A., Lima, G.R., Baracat, E.C., Nazário, A.C.P., 2005. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of themenstrual cycle. *Breast Cancer Res.* 7, 306–313.

Ordás, J., Millán, Y., De Los Monteros, A.E., Reymundo, C., De Las Mulas, J.M., 2004. Immunohistochemical expression of progesterone receptors, growth hormone and insulin growth factor-I in feline fibroadenomatous change. *Res Vet Sci.* 76, 227–233.

Papadogiannakis, E., Andritsos, G., Kontos, V., Spanakos, G., Koutis, C., Velonakis, E., 2010. Determination of CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs with leishmaniosis before and after prolonged allopurinol monotherapy. *Vet J.* 186, 262-263.

Papadogiannakis, E., Koutinas, A., 2015. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. Vet Immunol Immunopathol. 163, 94–102.

Pereira, M., Valério-Bolas, A., Saraiva-Marques, C., Alexandre-Pires, G., Fonseca, I.P., Santos-Gomes, G., 2019. Development of dog immune system: from in uterus to elderly. Vet Sci. 83, 1-14.

Pires, M.A., Payan-Carreira, R., 2015. Resident macrophages and lymphocytes in the canine endometrium. Reprod Domest Anim. 50, 740–749.

Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Carvalho, A.T., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Oliveira, R.C., 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 128, 87-95.

Root Kustritz, M.V., 2006. Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. Theriogenology. 66, 567-574.

Rosypal, A.C., Troy, G.C., Zajac, A.M., Frank, G., Lindsay, D.S., 2005. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. J Parasitol. 91, 970-972.

Santos-Gomes, G.M., Rodrigues, O.R., Marques, C., 2008. Resposta imunológica. In: Santos-Gomes, G.M., Fonseca, I.M.P. (Eds.), Leishmaniose canina. Chaves Ferreira Publicações: Lisboa, pp. 69-82.

Seelig JR, L.L., Beer, A.E., 1978. Transepithelial Migration of Leukocytes in the Mammary Gland of Lactating Rats. Biol Reprod. 17, 736-744.

Silva, K.L.O., Andrade, M.M.C., Melo, L.M., Perosso, J., Vasconcelos, R.O., Munari, D.P., Lima, V.M.F., 2014. CD4+FOXP3+ cells produce IL-10 in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 202, 313–318.

Silva, F.L., Rodrigues, A.A.M., Rego, I.O.P., Santos, R.L.H., Oliveira, R.G., Silva, T.M.A., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., Santos, R.L., 2008. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 151, 86–90.

Szekeres-Bartho, J., Polgar, B., Kozma, N., Miko, E., Par, G., Szereday, L., Barakonyi, A., Palkovics, T., Papp, O., Varga, P., 2005. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy.* 89, 118-125.

Tanneau, G.M., Hibrand-Saint, O.L., Chevaleyre, C.C., Salmon, H.P., 1999. Differential recruitment of T- and IgA B-lymphocytes in the developing mammary gland in relation to homing receptors and vascular addressins. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1581–1592.

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

Tolosa, E.M.C., Rodrigues, C.J., Behmer, O.A., Freitas-Neto, A.G. (Eds.), 2003. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica.* 2 ed. Manole, São Paulo, 331pp.

Yoshida, N., 2009. Molecular mechanisms of infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104, 101-107.

Zachary, J. F., McGavin, M.D. (Eds), 2016. Pathologic Basis of Veterinary Disease, 6th edn. Elsevier, Missouri, 1255 pp.

CAPÍTULO 3 – Resposta inflamatória do sistema genital de cadelas naturalmente infectadas por *Leishmania infantum**

Paulo Henrique Leal Bertolo^a, Maria Eduarda Bastos Andrade Moutinho da Conceição^a, Rafael Rocha Mello Emboaba da Costa^a, Ana Paula Prudente Jacintho^a, Rafael Silva Cipriano^b, Pamela Rodrigues Reina Moreira^c, Maricy Apparicio^a, Daniela Bernadete Rozza^d, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos^a

^aUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

^bCentro de Controle de Zoonoses, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

^cCentro Universitário de Rio Preto, São José do 'Rio Preto, São Paulo, Brasil.

^dUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Autor para correspondência: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Tel.: +55 16 3209 7368. E-mail: rosemeri.vasconcelos@unesp.br

RESUMO

O sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral (LV) apresenta lesões mais frequentes na genitália externa (vulva e vagina), sugerindo uma possível transmissão venérea de cadelas para cães machos. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória nos segmentos do sistema reprodutivo de cadelas naturalmente infectadas por *Leishmania infantum* e relacioná-la com a condição hormonal (níveis altos ou baixos de progesterona), com a carga parasitária local e com o imunofenótipo do infiltrado inflamatório local. Portanto, utilizou-se 16 cadelas adultas naturalmente infectadas por *L. infantum*, não castradas, não gestantes e livres de tumores. As cadelas foram divididas nos grupos G1 (n=5, fase alta de progesterona,) e G2 (n=11, fase baixa de progesterona). A carga parasitária e o imunofenótipo dos leucócitos infiltrados no sistema genital (CD3, CD4, CD8 e MCA874) foram avaliados por meio da técnica de imunohistoquímica. A lesão predominante foi o infiltrado inflamatório crônico, principalmente em vulva e vagina e, em menor proporção nos

segmentos da genitália interna (cérvix, útero, ovário). Os animais do grupo G1 apresentaram maior carga parasitária nos segmentos internos do TR e maior número de células positivas para CD3 (linfócito T) e MCA874 (macrófago). Os parâmetros CD4, CD8 e carga parasitária não diferiram entre os grupos. Entretanto, a análise multivariada mostrou que o grupo G1 apresentou correlação positiva com os subtipos de linfócitos T, macrófagos e carga parasitária, nos diferentes segmentos do TR, ou seja, quando aumentam os níveis de progesterona, ocorreu um aumento da população leucocitária e do número de células parasitadas no TR, mostrando que as fases do estro e diestro são favoráveis a manutenção da infecção.

Palavras-chave: Cão, Leishmaniose visceral, sistema reprodutivo, resposta imune, ciclo estral, hormônios esteroidais.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose presente na Europa, África, Ásia e Américas (WHO 2010), que é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e tem o cão como principal reservatório da doença na área urbana (Brasil, 2014). Estima-se que há milhões de cães infectados na América do Sul, com altas taxas de infecção em algumas áreas da Venezuela e do Brasil, onde a alta prevalência de infecção canina associa-se ao alto risco de infecção humana (Werneck et al. 2006).

A transmissão se dá por meio do mosquito vetor (Brasil 2014). No entanto, já foram relatados casos autóctones de LV em cães, em regiões com ausência do inseto vetor. Nesses casos a transmissão venérea ou vertical foi considerada (Duprey et al. 2006; Naucke e Lorentz 2012; Karkamo et al. 2014) e estas vias desempenham um papel epidemiológico significativo na disseminação e manutenção da doença, especialmente na ausência do vetor da LV (Turchetti et al. 2014).

Alguns estudos destacam a presença de *Leishmania* sp. no sistema reprodutor de cães machos naturalmente infectados, que está relacionada a lesões no prepúcio, glândula, testículo, epidídimo e próstata (Diniz et al. 2005; Amara et al. 2009; Benites et al. 2011; Mir et al. 2012; Boechat et al. 2016). No sistema reprodutor de cadelas infectadas já foi detectada *Leishmania infantum* na vulva, vagina, cérvix, útero e ovário (Silva et al. 2008; Boechat et al. 2016). Os hormônios esteroides (estrógeno e progesterona) regulam a atividade imunológica do trato reprodutivo, nas diferentes fases do ciclo estral (Herath et al. 2006). A progesterona induz resposta imunológica composta por células com perfil Th2 (Daher e Mattar 2009), com produção das citocinas IL-3, IL-4 e IL-10 e paralelamente inibe citocinas Th1, como INF- γ (Szekeres-Bartho et al. 2005).

O sistema imunológico uterino atua de maneira única em que precisa responder adequadamente aos patógenos e também tolerar alogênicos como os espermatozoides e o feto, e por isso, é tido como ambiente de privilégio imunológico. Este privilégio imune na interface materno-feta não significa ausência de leucócitos, é um processo ativo e regulado, no qual esteróides sexuais (progesterona na mulher), fatores imunorreguladores produzidos localmente, componente estrutural e um fenótipo distinto de leucócitos locais agem de maneira sinérgica para criar um ambiente que permite a propagação da espécie (Arck et al. 2014).

A progesterona interage com as células imunes promovendo papel imunorregulatório fundamental na manutenção da tolerância materna aos antígenos fetais alogênicos ou afetando o microambiente uterino inibindo respostas Th1 e Th17, suprimindo a atividade de células T CD4 efectoras e regulação dos linfócitos B, além de aumentar células Treg (Hughes et al., 2013).

No entanto, existem poucos estudos sobre a infecção natural por *L. infantum* no trato genital de cães, especialmente em fêmeas e pouco se sabe sobre o papel do sistema imune nesse compartimento. Portanto, este estudo teve o objetivo de avaliar as alterações histopatológicas do sistema genital de cadelas naturalmente infectadas por *Leishmania infantum* e relacionar estes achados com a condição hormonal (níveis altos ou baixos de progesterona), com a carga parasitária e com o imunofenótipo do infiltrado inflamatório local.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras

No estudo foram utilizadas 16 cadelas adultas, não castradas, não gestantes, sem predileção por raça e livres de processos patológicos sistêmicos e no sistema genital, tais como neoplasias e piometra. Todas as cadelas selecionadas foram diagnosticadas positivas para *Leishmania* sp., por meio de teste imunoenzimático (ELISA) e/ou teste rápido imunocromatográfico Dual Path Platform (DPP®) e por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) do linfonodo poplíteo. Os animais eram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Araçatuba (21° 12'32" Sul e 50° 25'58" oeste), estado de São Paulo, que é endêmico para LV (Moreira et al. 2010).

2.2 Coleta do sangue

Os animais foram submetidos à coleta de 6 mL de sangue periférico, por meio da venopunção da jugular externa. O sangue foi acondicionado em tubo contendo gel separador de coágulo (Ampulab, Belo Horizonte-MG, Brasil), para obtenção do soro para dosagem dos níveis séricos de progesterona. As amostras de soro sanguíneo foram obtidas por centrifugação (1500 rpm x 10min) do sangue total, sem

anticoagulante e após foram armazenadas em microtubos e estocadas a -20°C, até o momento da realização da dosagem sérica da progesterona, por ensaio imunoenzimático pelo método de quimioluminescência (Immulite, Siemens), em laboratório autônomo.

2.3 Análise da citologia vaginal

A citologia vaginal foi realizada com a utilização de escovas ginecológicas estéreis no canal vaginal. Os esfregaços foram corados com panóptico rápido (Laborclin, cód. 620529) e avaliados em microscopia de luz, para a determinação das porcentagens de células parabasais, intermediárias e superficiais, para identificação das fases do ciclo estral (Root Kustritz 2006).

O anestro é caracterizado pela predominância de células parabasais e intermediárias e pela ausência das células superficiais. No proestro observa-se células parabasais e intermediárias e poucas células superficiais. Durante o estro, encontramos aumento substancial de células superficiais, que corresponde a mais de 80% das células do esfregaço e menos de 5% de células parabasais ou intermediárias. No diestro verifica-se redução de 20% das células superficiais e aumento de pequenas células intermediárias (Root Kustritz 2006).

2.4 Grupos experimentais

As cadelas com LV foram divididas em dois grupos, de acordo com a dosagem dos níveis séricos de progesterona, achados da citologia vaginal e análise histopatológica do sistema genital, sendo estro e diestro (fase alta de progesterona, G1, n=5) e anestro e proestro (fase baixa de progesterona, G2, n=11), segundo descrito por Pires e Carreira (2015).

Todos os animais foram submetidos à eutanásia com overdose intravenosa de barbitúrico seguida da administração de cloreto de potássio, segundo determinação da Portaria interministerial nº 1.426/2008, do Ministério da Saúde do Brasil e da Resolução nº 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Brasil, 2008, CFMV, 2012). Em seguida foi realizado o exame necroscópico desses animais, no qual foram coletadas amostras dos segmentos do sistema genital (vulva, vagina, cérvix, corpo do útero, corno uterino e ovários) para as análises histopatológica e imunohistoquímica.

2.5 Avaliação Histopatológica

Os fragmentos do sistema genital foram fixados em solução de formol a 10% tamponado com fosfatos (0,15 Molar, pH 7,2), por 48 horas. Posteriormente, os tecidos foram processados de acordo com a técnica histológica de rotina, incluídos em parafina, cortados na espessura de 5µm e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (Tolosa et al. 2003). As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz e as alterações histopatológicas inflamatórias foram avaliadas em escores: ausente (-), discreto (+), moderado (++), acentuado (+++).

2.6 Avaliação Imunohistoquímica

Na técnica de imunohistoquímica foi avaliada a marcação de formas amastigotas de *Leishmania* sp. com soro de cão positivo para LV (modificado de Tafuri et al. 2004), de macrófagos (MCA 874, AbD Serotec, cód. 1209), linfócitos T (CD3, Dako, cód. A0452), linfócitos TCD4 (AbD Serotec, cód. MCA1999S) e linfócitos TCD8 (AbD Serotec, MCA1999S).

De uma forma geral, os protocolos de imunohistoquímica para os diferentes anticorpos (Tabela 1) foram constituídos por desparafinização das lâminas em estufa

(60°C) por uma hora, seguida da imersão em xilol (20 minutos). Após, os cortes histológicos foram hidratados em soluções de concentrações decrescentes de álcool até a lavagem em água destilada. A recuperação antigênica foi feita pelo calor (tabela 1). No bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se produto comercial (Hydrogen Peroxide Block, Spring, cód. DHP125) / 30 minutos ou utilizou-se solução de metanol e água oxigenada a 8%, por 30 min, protegido da luz, em temperatura ambiente. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi duplo, com produto comercial (Protein Block, Dako, cód. X0909, por 1 hora), por 30 minutos, seguido de incubação com solução de leite em pó desnatado (Molico®) diluído em água destilada a 8% / 1 hora, ambos em câmara úmida escura e em temperatura ambiente. O cromógeno utilizado foi diaminobenzidina (3,3-diaminobenzidina, Dako, cód. K3468-1), por 3 minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris (3 minutos). Entre cada passo foram realizadas lavagens dos cortes com solução tampão de TRIS HCl, pH 7,4 / 5 minutos e água destilada / 5 minutos.

Para os controles positivos foram utilizados tecidos indicados pelo fabricante de cada anticorpo, enquanto para os controles negativos utilizou-se o diluente de anticorpo (Antibody diluent with background reducing components, Dako, cod. S3022) em substituição ao anticorpo primário.

Tabela 1. Protocolo utilizado para os diferentes anticorpos na análise imunohistoquímica do trato reprodutor de cadelas com Leishmaniose Visceral.

Anticorpos primários	Recuperação antigênica	Diluição	Incubação/ temperatura	Conjugado	Bloqueio peroxidase
Leishmania	Câmara de pressão Pascal (Dako), Citrato ¹	1:500	2h/ temp. ambiente	Advance ³	M+P ⁶
MCA 874 (macrófagos)	Câmara de pressão Pascal (Dako), Citrato ¹	1:4000	18h/4°C	EnVision ⁴	M+P ⁶
CD3 (linfócitos T)	Câmara de pressão Pascal (Dako), Citrato ¹	1:350	2h/ temp. ambiente	EnVision ⁴	M+P ⁶
CD4 (linfócitos T)	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ²	1:150	18h/4°C	HRP(Spring) ⁵	HPB ⁷
CD8 (linfócitos T)	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ²	1:150	18h/4°C	HRP(Spring) ⁵	HPB ⁷

1- Tampão para recuperação antigênica (pH 6,0); 2- Tampão para recuperação antigênica (pH 9,0); 3- Complexo de polímeros ligados à peroxidase (Kit Advance HRP, Dako, cód. K4068); 4- Complexo de polímeros ligados à peroxidase (Kit EnVision Flex HRP, Dako, cód. K8000); 5- Complexo de polímeros ligados a peroxidase (Kit HRP, Spring, cód. DHP125); 6- Metanol + peróxido de hidrogênio, 8%, incubação antes do anticorpo primário; 7- Bloqueio da peroxidase endógena (Spring, cód. DHP125) com incubação após o anticorpo primário.

A densidade das células imunomarcadas para cada anticorpo foi determinada pela contagem das células nas áreas que apresentaram maior imunomarcação (*hot spot*), em dez campos de grande aumento (obj. 40x, área=0,19625 μm^2) (Moreira et al. 2010), em microscópio de luz (Nikon, E200). As imagens capturadas foram analisadas pelo software Cell Sens Standards Olympus Corporation (versão 1.9, 2009-2013).

2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 5. Inicialmente foi testada a normalidade dos resíduos (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade das variâncias (teste F de comparação de variância) de todos os parâmetros estudados. Naqueles que apresentaram distribuição normal, as médias

entre os grupos foram comparadas pelo teste T não pareado. Enquanto a média dos valores que apresentaram distribuição não Gauseana foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As comparações foram realizadas para cada segmento do trato reprodutivo entre os grupos. Os parâmetros intensidade de inflamação e carga parasitária receberam escore zero em alguns dos segmentos internos do TR, por isso foram submetidos a análise descritiva. A significância foi fixada para todos os testes em 5% ($p < 0,05$).

A análise estatística multivariada foi realizada no Software R (versão 3.6.3). Os dados de infiltrado inflamatório, carga parasitaria, MCA 874, CD3, CD4, CD8 e dosagem de progesterona foram avaliados entre os grupos 1 e 2 de cada segmento do trato reprodutor feminino, por meio do teste de Mann Whitney não pareado. Adicionalmente foi realizada uma análise de componentes principais utilizando o FactoMineR package no R. Os valores resultantes de cada variável apresentam-se como a mediana $\pm$ a faixa interquartil (IQR) e a significância foi declarada a $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

Todos os animais avaliados apresentaram inflamação crônica, caracterizada por um infiltrado composto por plasmócitos, linfócitos e macrófagos, em pelo menos um dos segmentos do sistema genital. Os segmentos da genitália externa (vulva, vagina e cérvix) foram mais acometidos que os segmentos da genitália interna (corpo do útero, corno uterino e ovário).

A alteração mais frequente foi dermatite vulvar crônica e a intensidade da inflamação variou de discreta a acentuada, predominantemente multifocal, ao redor de anexos cutâneos. A presença de inflamação granulomatosa nem sempre foi observada associada ao infiltrado inflamatório crônico. Ademais, o infiltrado

inflamatório estava associado ou não a formas amastigotas do parasita presentes no citoplasma de macrófagos localizados na derme superficial, derme profunda, musculatura e na lâmina própria da região mucosa vulvar (Figura 1) e vaginal.

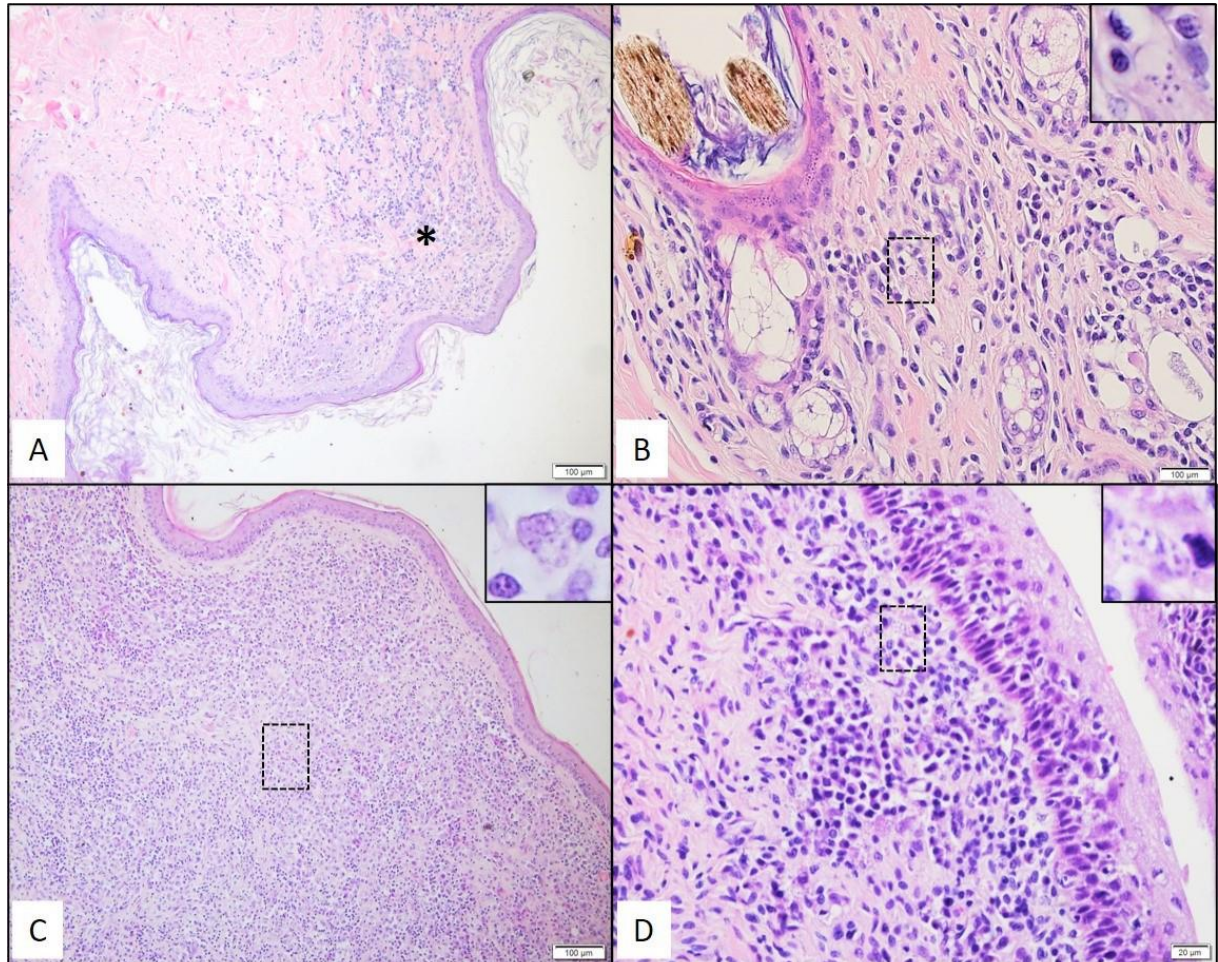


Figura 1 – Fotomicrografias das alterações histopatológicas na vulva de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) Dermatite vulvar com infiltrado inflamatório multifocal na derme superficial (asterisco) (Barra = 100µm). B) Infiltrado inflamatório crônico associado a formas amastigotas de *Leishmania* sp. (detalhe), ao redor de anexos da vulva (Barra = 20µm). C) Inflamação vulvar difusa com macrófagos parasitados (detalhe) (Barra = 100µm). D) Acentuada inflamação na mucosa vulvar com formas amastigotas de *Leishmania* sp. macrófagos da lâmina própria (detalhe) (Barra = 20µm). Hematoxilina-eosina.

Alguns animais também apresentaram infiltrado inflamatório histio-linfoplasmocitário predominantemente discreto associado ou não a formas amastigotas de *Leishmania* sp. nos demais segmentos do sistema genital. Na vagina e cérvix o processo inflamatório foi visualizado na lâmina própria da mucosa e camada

Infiltrado crônico (seta) associado a macrófagos espumosos (seta e detalhe) no estroma do ovário, adjacente a um corpo lúteo (asterisco) (Barra = 100µm). Hematoxilina-eosina. Obj. 10x.

A inflamação envolveu os diferentes segmentos do sistema reprodutivo dos animais (tabela 2) e na comparação entre os grupos não houve diferença significativa na vulva ($p = 0,71$) e na vagina ($p = 0,10$) e somente a cérvix diferiu significativamente entre os grupos ($p = 0,013$). Os segmentos corpo do útero e corno uterino não foram submetidos à comparação estatística, pois apresentaram frequência elevada do escore ausência de lesão (tabela 2). Entretanto, nota-se no grupo G1 maior frequência e intensidade de inflamação nos compartimentos de corpo uterino, corno uterino e ovário.

Tabela 2 – Frequência e intensidade de inflamação nos segmentos do sistema reprodutivo de cadelas com Leishmaniose Visceral.

Grupos	Cadela	Dosagem progesterona (ng/mL)	Vulva	Vagina	Cérvix	Corpo útero	Corno uterino	Ovário
Grupo G1 (Fase de progesterona alta)	1	31,30	+	+	+	-	+	-
	2	8,30	+	+	+	+	+	-
	3	4,97	++	+	+	+	++	-
	4	2,46	++	+	+	+	+	+
	5	NA	++	++	++	++	++	+
Grupo G2 (Fase de progesterona baixa)	6	0,80	++	+	+	-	-	-
	7	0,30	+	+	-	-	-	-
	8	0,48	+	+	+	-	-	-
	9	0,82	++	+	-	-	-	-
	10	0,30	++	+	-	-	+	-
	11	0,79	+	-	-	-	-	-
	12	0,37	+	-	-	-	-	-
	13	0,27	++	+	-	-	-	-
	14	0,32	+++	+	+	-	-	-
	15	0,2	+	+	-	-	-	-
	16	NA	-	-	-	-	-	-
Valor de P	-	-	0,710	0,100	0,013	NT	NT	NT

(-) Ausente; (+) Discreto; (++) Moderado; (+++) Acentuado; NT – Não avaliado pelo teste estatístico; ng/mL (Nanograma por mililitro); NA – Não foi avaliada a dosagem sérica de progesterona; Valor de P na comparação entre os grupos G1 e G2 (Teste de Mann-Whitney).

Na avaliação imunohistoquímica foram identificadas formas amastigotas intracitoplasmáticas em macrófagos (Figura 3), em meio ao infiltrado inflamatório em todos os segmentos avaliados (vulva, vagina, cérvix, corpo do útero, corno uterino e ovário), bem como, verificou-se imunomarcacão positiva em membrana para linfócitos T CD3 e citoplasmática para linfócitos TCD4, CD8 e para macrófagos (Figura 4).

De uma maneira geral, os leucócitos infiltrados na região vulvar predominaram ao redor dos anexos cutâneos. Na vagina e cérvix, a distribuição desses leucócitos foi principalmente intraepitelial e na lâmina própria. No corpo e cornos uterinos, os leucócitos estavam distribuídos principalmente na camada endometrial. No ovário, os leucócitos foram observados no tecido conjuntivo e, por vezes, macrófagos estavam presentes no interior de corpo lúteo.

A carga parasitária dos 16 animais avaliados (tabela 3) foi detectada na vulva de 12 animais (75%), na vagina em 6 animais (37,5%), na cérvix de 4 animais (25%), no corpo do útero e corno uterino de 3 animais (18,75%) e no ovário de um animal (6,25%). Na comparação entre os grupos não houve diferença entre os segmentos de vulva ($p = 0,680$), vagina ($p = 0,297$) e cérvix ($p = 0,074$). Similar ao observado na análise do processo inflamatório, no corpo do útero, corno uterino e ovário notou-se maior carga parasitária nos animais do grupo G1 (tabela 3).

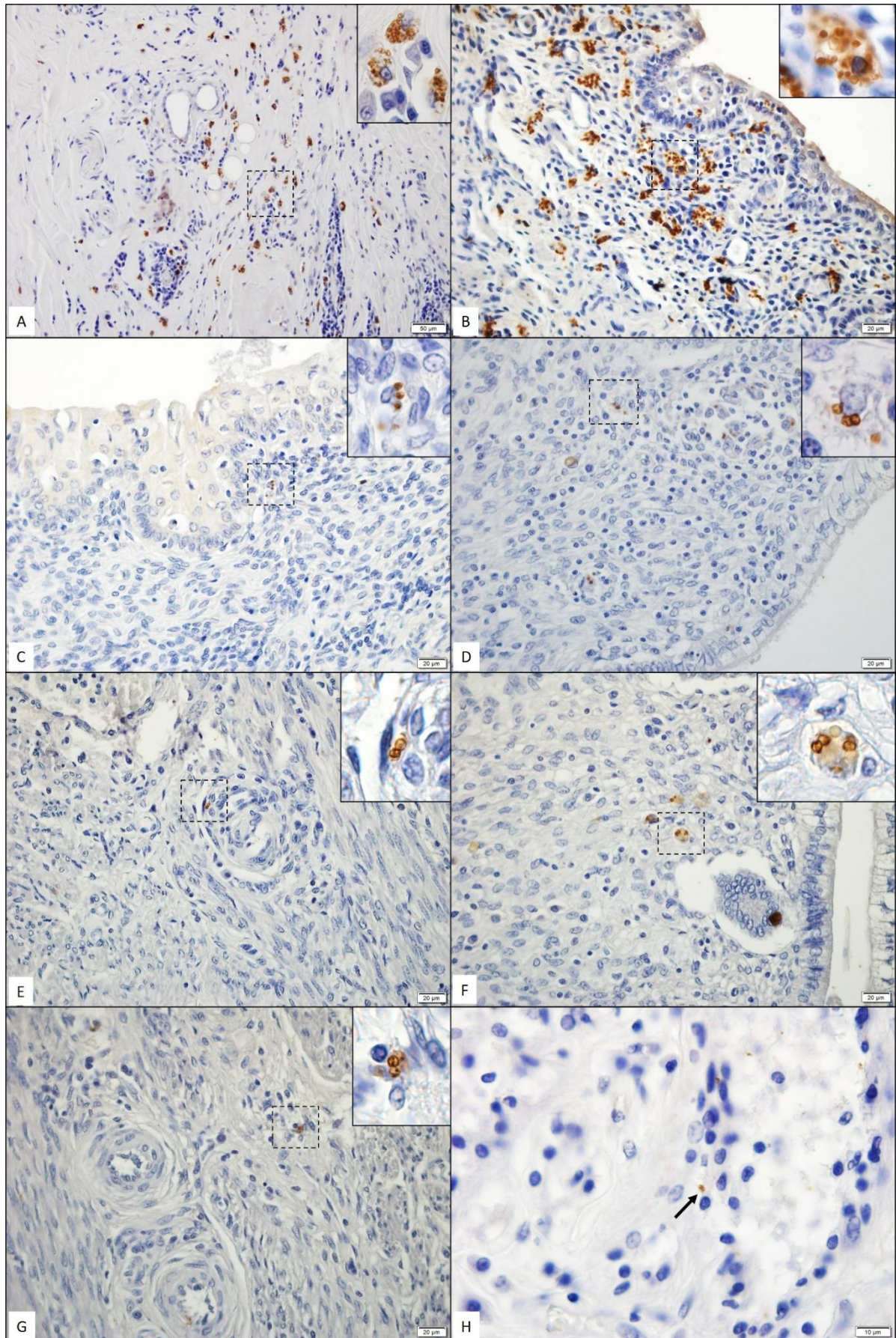


Figura 3 – Fotomicrografias da carga parasitária do sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) Derme vulvar com presença de formas amastigotas intracitoplasmáticas em macrófagos ao redor de anexos (detalhe) (Barra = 50µm). B) Notar macrófagos psarasitados na lâmina própria da vagina (detalhe) (Barra = 20µm). C) Presença do parasita no infiltrado adjacente a mucosa da cérvix (detalhe) (Barra = 20µm). D) Parasita presente na submucosa do corpo do útero (detalhe) (Barra = 20µm). E) Formas amastigotas intracitoplasmáticas em macrófagos do infiltrado perivascular do estrato vascular (detalhe) do corpo do útero (Barra = 20µm). F) Formas amastigotas presentes na inflamação do endométrio do corno uterino (detalhe), próximo as glândulas endometriais (Barra = 20µm). G) Parasita em meio a inflamação perivascular na camada do estrato vascular (detalhe) do corno uterino (Barra = 20µm). H) Macrófagos parasitados no corpo lúteo do ovário (detalhe) (Barra = 20µm). Complexo de polímeros ligados à peroxidase.

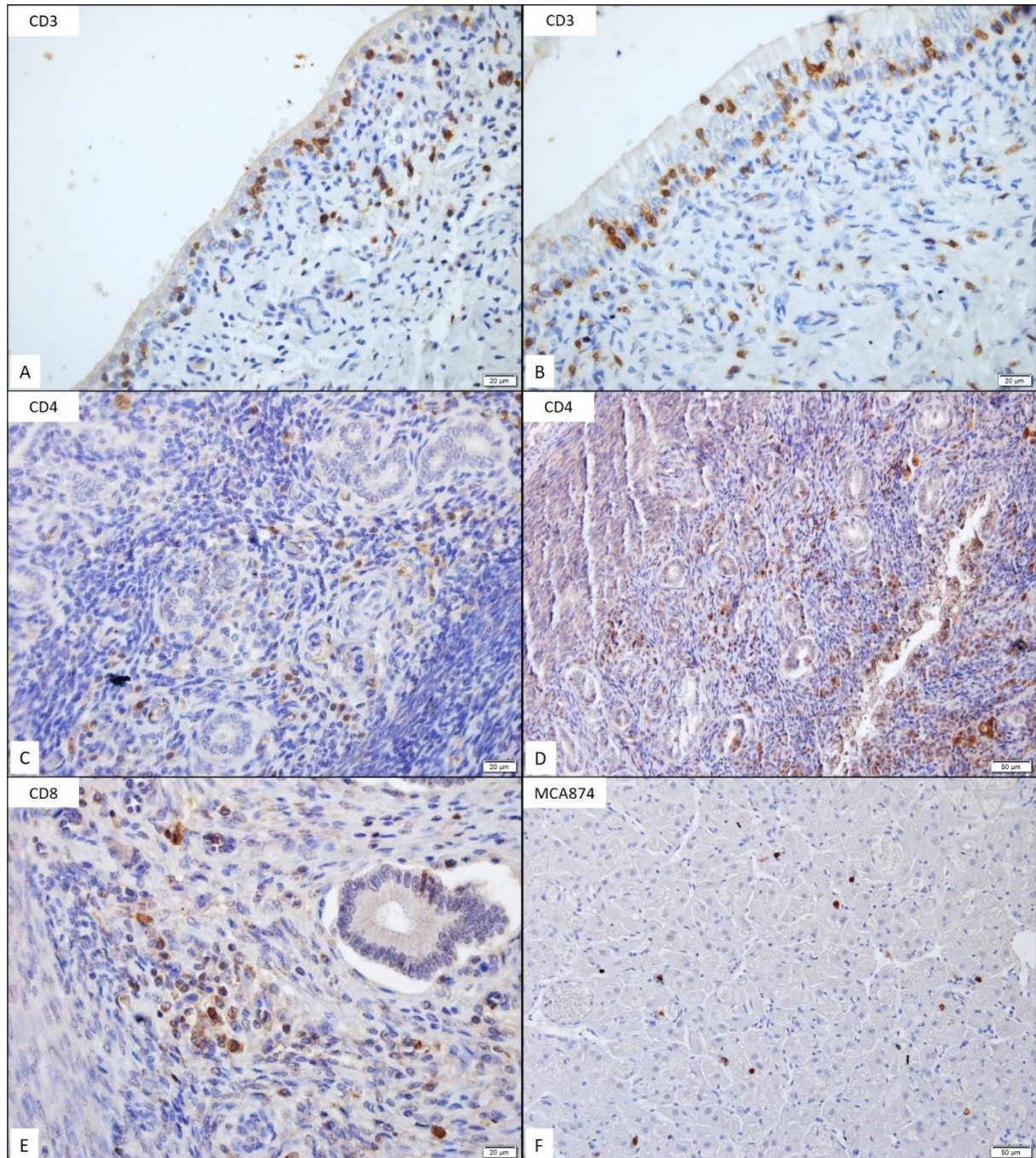


Figura 4 – Fotomicrografias da análise imunohistoquímica do sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral. A) Imunomarcção na membrana de linfócitos T CD3 na lâmina própria e no epitélio vaginal (Barra = 20µm). B) Imunomarcção na membrana de linfócitos T CD3 distribuídos no endométrio do corno uterino (Barra = 20µm). C) Marcação citoplasmática de linfócitos CD8 na lâmina própria da cérvix (Barra = 20µm). D) Marcação citoplasmática de linfócitos CD4 distribuídos na camada endometrial do corpo do útero (Barra = 50µm). E) Linfócitos CD4 positivos no endométrio do corno uterino (Barra = 20µm). F) Imunomarcção positiva de macrófagos no corpo lúteo ovariano (Barra = 50µm). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.

Tabela 3 – Valores da dosagem de progesterona e média de macrófagos parasitados avaliados em 10 campos de grande aumento, no sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral.

Grupos	Cadela	Dosagem progesterona (ng/mL)	Vulva	Vagina	Cérvix	Corpo útero	Corno uterino	Ovário
Grupo G1 (Fase de progesterona alta)	1	31,30	3,5	0	0	0	0	0
	2	8,30	4,0	0,7	0,5	0,2	0,2	0
	3	4,97	11,6	6,8	1,1	7,6	8,6	0,2
	4	2,46	0	0	0	0	0	0
	5	NA	11,8	7,9	1,0	0,5	0,7	0
Grupo G2 (Fase de progesterona baixa)	6	0,80	52,3	0,9	0	0	0	0
	7	0,30	0	0	0	0	0	0
	8	0,48	24,4	0	0	0	0	0
	9	0,82	67,6	24,5	1,0	0	0	0
	10	0,30	3,1	0	0	0	0	0
	11	0,79	0	0	0	0	0	0
	12	0,37	7,2	0	0	0	0	0
	13	0,27	2,9	0	0	0	0	0
	14	0,32	170,5	6,6	0	0	0	0
	15	0,2	4,5	0	0	0	0	0
	16	NA	0	0	0	0	0	0
Valor de P	-	-	0,680	0,297	0,074	NT	NT	NT

NT – Não avaliado pelo teste estatístico; ng/mL (Nanograma por mililitro); NA - Não foi avaliada a dosagem sérica de progesterona; Valor de P na comparação entre as medianas dos grupos G1 e G2 (Teste de Mann-Whitney).

Na análise estatística dos leucócitos houve diferença significativa (Figura 5) entre os grupos nos segmentos de corpo do útero e corno uterino para a marcação de macrófagos ($p = 0,020$, $p = 0,041$, respectivamente) e para linfócitos T CD3 ($p = 0,002$,

$p = 0,004$, respectivamente). Os demais parâmetros não diferiram entre os grupos, em cada segmento do TR.

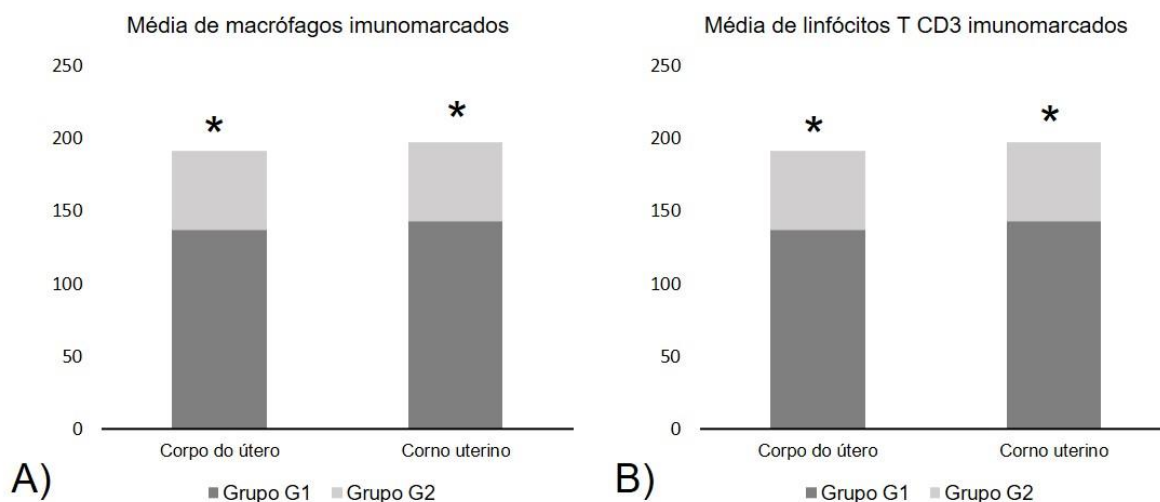


Figura 5 – Médias de células imunomarcadas entre os grupos G1 e G2, com diferença significativa entre os grupos (*). A) Para o anticorpo MCA 874 no corpo do útero ($p = 0,020$) e corno uterino ($p = 0,041$). B) Para o anticorpo CD3 no corpo do útero ($p = 0,002$) e corno uterino ($p = 0,004$). Grupo G1 (Fase de progesterona alta); Grupo G2 (Fase de progesterona baixa). Teste T não pareado.

O grupo 1 apresentou maior dosagem de progesterona, maior marcação de linfócitos T (CD3) na cérvix, infiltrado inflamatório, carga parasitária e macrófagos (MCA874) no corpo do útero, maior infiltrado inflamatório e carga parasitária no corno do útero, e maior infiltrado inflamatório e macrófagos (MCA874) no ovário ($P < 0,05$; Tabela 4).

Mediante a análise de componentes principais (PCA) foram escolhidas 20 das 37 variáveis analisadas que explicaram 72,16% da variação acumulada, e resultou na separação do grupo 1 e grupo 2 (Figura 6). Animais do grupo 2 foram distribuídos na sua maioria na região negativa do componente 1 (Dim1), enquanto que os animais do grupo 1 localizaram-se principalmente na região positiva do mesmo componente. Assim, o grupo 1 foi correlacionado positivamente ao CD4 ($r = 0,80$) e CD8 ($r = 0,65$) na Vulva epiderme (VE); no ovário (OV) ao CD3 ($r = 0,75$), CD4 ($r = 0,77$), CD8 ($r = 0,58$),

infiltrado inflamatório ($r=0,58$) e carga parasitária (PB) ($r=0,44$). No corno do útero (UTN) ao CD3 ($r=0,92$), CD4 ($r=0,88$), CD8 ($r=0,85$), MCA 874 ($r=0,85$), e PB ($r=0,50$); também associados positivamente ao CD3 ($r=0,89$), CD4 ($r=0,87$), CD8 ($r=0,81$), e PB ($r=0,49$) no corpo do útero (UTR), e ao CD3 ($r=0,80$) e CD4 ($r=0,86$) na vagina (VA). Enquanto o grupo 2 apresentou correlação positiva ao MCA 874 no cérvix (CX) ($r=0,46$), e vagina ($r=0,48$), e a dosagem de progesterona ($r=0,34$).

Tabela 4. Mediana $\pm$ faixa interquartil das variáveis mensuradas no sistema genital de cadelas com Leishmaniose Visceral.

		G1		G2		P valor
		Mediana	IQR	Mediana	IQR	
	Progesterona Dosagem	4,97 ^a	3,6	0,32 ^b	0,35	0,0022
Segmento						
Vulva epiderme	Infiltrado inflamatório	2	1	1	1	0,7099
	Carga parasitária	3,5	8,6	4,5	36,9	0,6895
	MCA 874	20	19,8	7,2	14	0,0892
	CD3	93,2	46,2	63,7	48,8	0,4277
	CD4	65,8	37,1	41,1	38,15	0,2572
	CD8	45,5	10,1	37,9	28,55	0,4966
Vagina	Infiltrado inflamatório	1	0	1	0,5	0,0998
	Carga parasitária	0,7	6,8	0	0,45	0,2976
	MCA 874	9	7	6,4	4,55	0,1740
	CD3	31,3	11,5	33,4	30,4	0,6504
	CD4	14,7	18,2	15,1	3,9	0,6504
	CD8	12,4	12,7	15,3	3,8	0,6504
Cérvix	Infiltrado inflamatório	1	0	0	0,5	0,0075
	Carga parasitária	0,5	1	0	0	0,0741
	MCA 874	8,9	5,6	2,6	1	0,1127
	CD3	65,2 ^a	22,2	30,4 ^b	18	0,0541
	CD4	21,4	5	10,6	3,25	0,0232
	CD8	20,5	11,2	14,5	5	0,4277
Corpo do útero	Infiltrado inflamatório	1 ^a	0	0 ^b	0	0,0012
	Carga parasitária	0,2 ^a	0,5	0 ^b	0	0,0078
	MCA 874	4,8 ^a	2,6	2,6 ^b	1,25	0,0312
	CD3	138,9	65,2	33,1	35,05	0,0698
	CD4	17,1	11,2	11,9	9,85	0,4277
	CD8	15,7	7,2	11,9	5,4	0,3951
Corno uterino	Infiltrado inflamatório	1 ^a	1	0 ^b	0	0,0007
	Carga parasitária	0,2 ^a	0,7	0 ^b	0	0,0078

Ovário	MCA 874	6,4	1,1	1,9	0,6	0,0604
	CD3	114,3	84,6	40,6	27,25	0,1408
	CD4	22,3	7,3	11,2	2	0,1116
	CD8	17,7	4,7	12,8	4,35	0,2321
	Infiltrado inflamatório	0 ^a	1	0 ^b	0	0,0382
	Carga parasitária	0	0	0	0	0,1775
	MCA 874	5,6 ^a	2,2	3,2 ^b	1,35	0,0197
	CD3	47,1	63,3	40,7	26,15	0,9098
	CD4	2,1	1,3	1,9	0,6	0,2537
	CD8	1,7	0,3	1,7	0,6	0,9093

Letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam significância pelo teste de Mann-Whitney não pareado ($p \leq 0,05$).

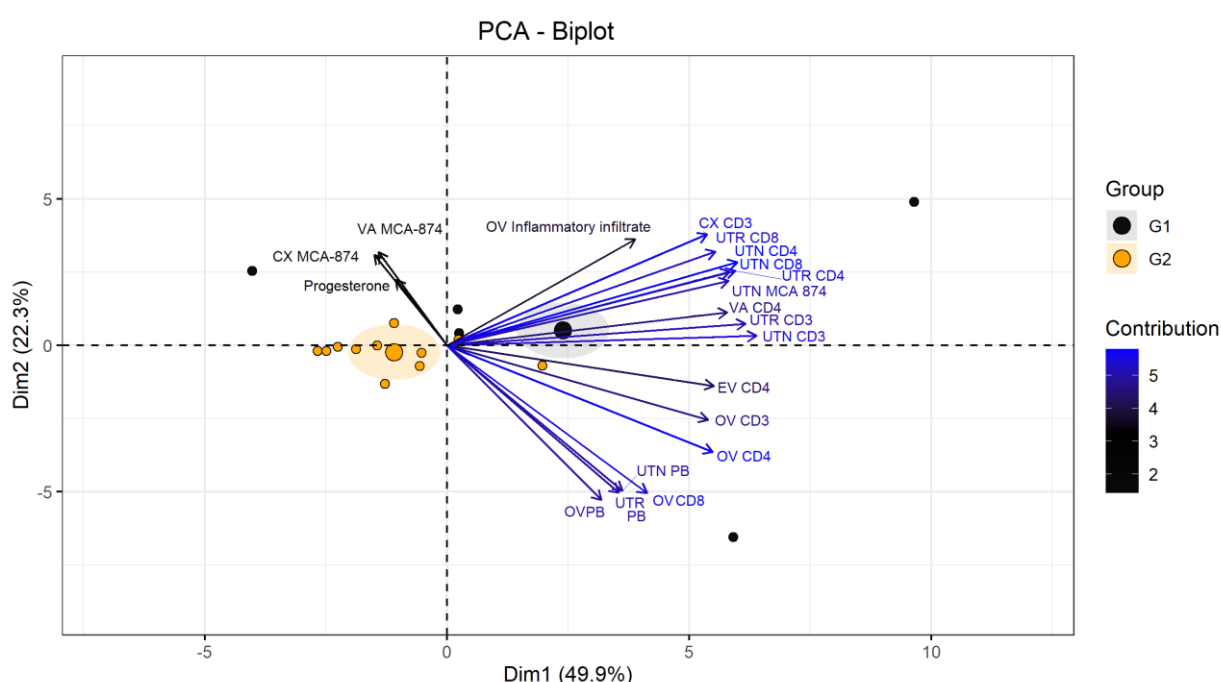


Figura 6 - Análise de componentes principais (PCA) das medidas de animais do grupo 1 e grupo 2. Variáveis com maior contribuição apresentam-se coloridas em azul. Círculos maiores no centro das elipses representam a média dos animais em cada grupo. PB = carga parasitaria. VE = Vulva epiderme. UTN = corno do útero. UTR = corpo do útero. VA = vagina. CX = cérvix. OV = ovário.

4. DISCUSSÃO

As lesões genitais em cadelas naturalmente infectadas por *L. infantum* mais comumente observadas foram dermatite vulvar, seguida de vaginite, com inflamação crônica associada ou não à formação de granulomas, predominantemente ao redor de anexos cutâneos na vulva, similar ao descrito por outros autores (Silva et al. 2008;

Boechat et al. 2016). Ainda, Silva et al. (2008) e Boechat et al. (2016) relataram que a vulva e vagina apresentaram maior carga parasitária, similar ao presente estudo. Este fato justifica-se pela vulva ser uma extensão da pele, portanto mais susceptível ao contato com os flebótomos vetores da LV.

Silva et al. (2008) observaram infiltrado inflamatório na vulva tanto de cadelas infectadas quanto nas do grupo controle. Estes autores reportaram apenas dois animais com formas amastigotas e, por esta razão, sugeriram que, a resposta inflamatória na vulva de cadelas seria uma lesão inespecífica, não associada ao parasita. No presente estudo, a alteração inflamatória vulvar estava associada à carga parasitária local, pois o parasita foi identificado em 75% dos animais. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2, possivelmente pelo fácil acesso do mosquito à região vulvar.

No presente estudo, a carga parasitária encontrada na vulva e vagina (75% e 37,5%, respectivamente) foi similar à reportada por Boechat et al. (2016) 70% e 35%, respectivamente, mas superior ao referido por Silva et al. (2008) 20% para ambos os segmentos e Magro et al. (2017) 23,5% e 17,7%, respectivamente. Ademais, estes autores não observaram imunomarcção de parasitas nos segmentos da genitália interna, enquanto no presente estudo e no de Boechat (2016) amastigotas foram detectadas nos segmentos da genitália interna, assim como observado também por Boechat et al. (2016). Entretanto, Silva et al. (2008) detectaram DNA de *Leishmania infantum* (PCR) em todos os segmentos do sistema genital, porém esta técnica molecular não permite identificar o sítio anatômico exato onde o parasita está localizado no sistema genital.

O presente estudo identificou a presença do parasita na mucosa vulvar e na mucosa vaginal, o que pode indicar uma possível transmissão venérea de cadelas para cães machos, conforme foi sugerido por Boechat et al. (2016). Por outro lado, Silva et al. (2009) sugerem que essa via de transmissão sexual tende a ser unidirecional de cães machos para cadelas, por considerarem que o parasita não tem tropismo pelo sistema genital feminino. Estudos adicionais são necessários para elucidar esta questão.

Em relação à carga parasitária na mucosa vaginal, não encontramos diferença entre os grupos G1 e G2, o que pode indicar que a presença do parasita neste segmento do sistema genital não é influenciada pela ação da progesterona. Curiosamente, notou-se uma íntima relação do parasita com a lâmina própria da mucosa vaginal, o que sugere uma possível via de eliminação do parasita para o lúmen vaginal. Este achado também foi reportado por Magro et al. (2017), os quais detectaram a presença de DNA de *L. infantum* nas secreções vaginais de cadelas infectadas, com menor incidência em animais cujos níveis de estrógenos estavam mais elevados.

A presença de formas amastigotas nos segmentos da genitália interna em nosso estudo corrobora com o observado por Boechat et al. (2016) e ratificam a possibilidade de transmissão vertical, como demonstrado por Rosypal et al. (2005). Outrossim, encontramos maior carga parasitária nos segmentos da genitália interna nos animais do grupo G1, aqueles sob maior influência da progesterona. Sabe-se que os hormônios estrógeno e progesterona afetam e modulam a ação do sistema imune durante as diferentes fases do ciclo estral. Na literatura é fato conhecido que o útero está mais susceptível a infecções durante a fase progesterônica do ciclo e na gestação

(Foster 2016). A progesterona possui efeito imunorregulatório sobre linfócitos T; estes, passam a sintetizar uma proteína imunomodulatória, o fator bloqueador induzido pela progesterona (PIBF), que inibe a liberação de ácido araquidônico, a atividade de células NK e modifica o equilíbrio de citocinas, favorecendo uma resposta imune do tipo Th2 (IL-3, IL-4 e IL-10) neste ambiente. Paralelamente, inibe as citocinas Th1, como IFN- γ (Szekeres-Bartho et al. 2005).

A resistência a LV está associada a uma resposta do tipo Th1, marcada por níveis elevados de IFN- γ , TNF e IL-2. Os cães susceptíveis tendem a apresentar uma resposta imune humoral do tipo Th2 (Barbiéri 2006; Santos-Gomes 2008). Por outro lado, o estrógeno aumenta localmente a resistência uterina e ativa uma resposta imune Th1 (Sugiura et al. 2004). Para Papadogiannakis e Koutinas (2015), o IFN- γ é essencial para a ativação de macrófagos e morte intracelular de *Leishmania* sp. Magro et al. (2017) observaram menor incidência de secreções vaginais positivas para *L. infantum* (PCR) em cadelas com maiores níveis de estrógeno, sugerindo que o estrógeno favorece uma resposta anti-leishmania. Diante desses fatos, pode-se inferir que o efeito imunomodulatório da progesterona favoreceu a permanência do parasita nos segmentos internos do trato genital dos animais do grupo G1.

Pires e Payan-Carrera (2015) estudaram a população de leucócitos residentes no endométrio de cadelas saudáveis e mostraram que a população de células imunes nesse ambiente era de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. Os linfócitos T predominaram nas fases de anestro e proestro. No presente estudo a maior média de linfócitos T e macrófagos foi verificada no endométrio (grupo G1). Possivelmente a presença do parasita e a fase hormonal podem ter estimulado a migração dessas células para esses locais. Entretanto, a proporção de linfócitos TCD4 foi maior que

CD8 e que provavelmente pelo efeito imunomodulatório da progesterona, criando um ambiente imunossupressor no trato genital das cadelas com LV.

A análise multivariada permitiu identificar que com o agrupamento das variáveis foi possível explicar 72,16% da variação acumulada, separando os grupos 1 e 2, tendo sido observada uma correlação positiva para os subtipos de linfócitos T (CD3, CD4, CD8), inflamação e carga parasitária nos segmentos do TR com o aumento dos níveis de progesterona (G1). No grupo G2, apenas os macrófagos na cérvix e vagina tiveram correlação positiva com os menores níveis de progesterona. Em estudos com modelos murinos relatou-se que a imunotolerância no testículo e útero grávido é mantida por hormônios esteroidais, como a testosterona e a progesterona respectivamente, uma vez que um ambiente imunossuprimido favorece a preservação das espécies, pela manutenção da integridade das funções reprodutivas (Arck et al. 2014). Por este fato, no presente estudo, o perfil celular inflamatório possivelmente sofre uma influência regulatória da progesterona para fenótipos celulares com perfil Th2.

Segundo Arck et al. (2014), a manutenção da imunotolerância no útero grávido é feita pela expansão dos linfócitos Treg (CD4⁺), de macrófagos e células dendríticas tolerogênicas e, pela supressão dos linfócitos T CD4 efetores e dos linfócitos B por apoptose (FAS/IDO dependente). Na LV canina a predominância de macrófagos regulatórios M2 já foi descrita (Moreira et al. 2016), bem como de células Treg no baço de cães com LV, o qual estava associado a altos níveis de IL-10 e redução de linfócitos T circulantes (Silva et al. 2014). Portanto, com estes estudos fica claro que na LV o ambiente imunossupressor favorece o escape imune do parasita. Esse efeito sistêmico, com desvio Th2 da resposta imune, pode ser potencializado localmente no sistema genital pela condição hormonal. Vale lembrar que as células Treg são

eficientes na manutenção da imunotolerância, pois produzem citocinas (IL-10 e TGF- β), que inibem a ativação de qualquer célula efetora. Na gestação, a modulação deste perfil de resposta é feita pela progesterona, a fim de evitar a rejeição do embrião (Pereira et al., 2019).

Paralelamente, no ovário das cadelas com LV verificou-se a presença de macrófagos associados ao corpo lúteo. Na literatura relata-se que os macrófagos desempenham papéis diversos em eventos intraovarianos, incluindo foliculogênese, reestruturação do tecido na ovulação e na formação e regressão do corpo lúteo, reforçando seu papel na regulação da função ovariana (Wu et al., 2004).

Em resumo, a imunotolerância do sistema genital, em especial do útero é favorecida pela predominância de progesterona no ciclo hormonal da cadela (grupo G1). Este ambiente imunossuprimido pode influenciar no perfil de leucócitos que compõe o infiltrado inflamatório do sistema genital de cadelas com LV, contribuindo para a persistência do parasita e cronicidade da infecção.

5. CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo foi possível concluir que:

- A fase do ciclo reprodutivo, com níveis mais altos de progesterona influenciou o perfil inflamatório do trato reprodutivo das cadelas e a presença do parasita nestes locais.
- O sistema genital de cadelas com LV apresenta maior envolvimento da genitália externa (vulva e vagina).
- A presença do parasita na mucosa vulvar e vaginal sugere uma possível transmissão venérea de cadelas para cães machos.

- A presença de formas amastigotas na genitália interna (útero e cérvix) pode indicar a possibilidade de transmissão vertical.

Cumprimento aos padrões éticos: O presente estudo com os animais foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista (CEUA-UNESP), Campus de Jaboticabal, sob nº Protocolo 009028/17.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro. Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (São Paulo, Brasil) por disponibilizar os animais deste estudo e pela colaboração dos funcionários do setor. Ao Setor de Patologia Veterinária, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP/FMVA), por disponibilizar as instalações para a realização do exame necroscópico das cadelas.

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

REFERÊNCIAS

Amara A, Mrad I, Melki MK, Mrad MB, Rejeb A (2009) Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. *Revue Méd Vét* 160: 54–60

Arck P, Solano ME, Walecki M, Meinhardt A (2014) The immune privilege of testis and gravid uterus: Same difference? *Mol Cell Endocrinol* 382: 509–520. doi: 10.1016/j.mce.2013.09.022

Barbiéri CL (2006) Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 28: 329-337. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x

Benites AP, Fernandes CE, Brum KB, Abdo MAGS (2011) Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesq Vet Bras* 31: 72–77. doi: 10.1590/S0100-736X2011000100011

Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, Rodrigues FCC, Oliveira VC, Oliveira RVC, Menezes RC (2016) Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitol Res* 115: 2371-2379. doi: 10.1007/s00436-016-4987-4

BRASIL (2008) Ministério da Saúde. Portaria interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008 – Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. IOP Publishing PhysicsWeb. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html.

Acessado em 07 de Junho de 2020

BRASIL (2014) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. IOP Publishing PhysicsWeb. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf. Acessado em 12 de Janeiro de 2020

Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) (2012) Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012 – Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. IOP Publishing PhysicsWeb.

<http://www2.cfmv.gov.br/manual/arquivos/resolucao/1000.pdf>. Acessado em 20 de Fevereiro de 2020

Daher S, Mattar R (2009) Gestação: um fenômeno imunológico? *Rev Bras Alerg Immunopatol* 32: 63-67

Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL (2005) Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol* 42: 650–658. doi: 10.1354/vp.42-5-650

Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM (2006) Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis* 12: 440–446. doi: 10.3201/eid1203.050811

Foster RA (2016) Female reproductive system and mammae. In: Zachary JF, McGavin MD (eds) *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6th edn. Elsevier, Missouri, pp 1085-1126.

Herath S, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM (2006) Use of the cow as large animal model of uterine infection and immunity. *J Reprod Immunol* 69, 13-22. doi: 10.1016/j.jri.2005.09.007

Hughes GC, Clark EA, Wong AH (2013) The intracellular progesterone receptor regulates CD4+ T cells and T cell-dependent antibody responses. *J Leukoc Biol* 93: 369-375. doi: 10.1189/jlb.1012491

Karkamo V, Kaistinen A, Näreaho A, Dillard K, Vainio-Siukola K, Vidgrén G, Tuoresmäki N, Antilla M (2014) The first report of autochthonous nonvector- borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Vet Scand* 56:84. doi: 10.1186/s13028-014-0084-9

Magro AG, Assis VP, Silva LC, Tafuri WL, Silva SO, Melo MN, Valle GR (2017) *Leishmania infantum* is present in vaginal secretions of naturally infected bitches at lower levels in oestrogenized bitches than in non-oestrogenized bitches. *Acta Parasitol* 62: 625–629. doi: 10.1515/ap-2017-0076

Mir F, Fontaine E, Reyes-Gomez E, Carlus M (2012) Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. *J Small Anim Pract* 53: 419–422. doi: 10.1111/j.1748-5827.2012.01224.x

Moreira PR, Vieira LM, Andrade MM, Bandarra MB, Machado GF, Munari DP, Vasconcelos RO (2010) Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 107: 605–613. doi: 10.1007/s00436-010-1902-2

Moreira PRR, Fernando FS, Montassier HJ, André MR, Vasconcelos RO (2016) Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 226: 69–73. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.06.032

Naucke TJ, Lorentz S (2012) First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors* 5:67. doi: 10.1186/1756-3305-5-67

Papadogiannakis E, Koutinas A (2015) Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 163: 94–102. doi: 10.1186/1756-3305-5-67

Pereira M, Valério-Bolas A, Saraiva-Marques C, Alexandre-Pires G, Fonseca IP, Santos-Gomes G (2019) Development of dog immune system: from in uterus to elderly. *Vet Sci* 83: 1–14. doi: 10.3390/vetsci6040083

Pires MA, Payan-Carreira R (2015) Resident macrophages and lymphocytes in the canine endometrium. *Reprod Domest Anim* 50: 740–749. doi: 10.1111/rda.12567

Reis AB, Martins-Filho OA, Carvalho AT, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Oliveira RC (2009) Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 87-95. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.307

Root Kustritz MV (2006) Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology* 66: 567-574. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.05.003

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS (2005) Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol* 91: 970-972. doi: 10.1645/GE-483R.1

Santos-Gomes GM, Rodrigues OR, Marques C (2008). Resposta imunológica. In: Santos-Gomes GM, Fonseca IMP (eds) *Leishmaniose canina*. Chaves Ferreira Publicações, Lisboa, pp 69-82

Silva FL, Rodrigues AAM, Rego IOP, Santos RLH, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL (2008) Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 151: 86–90. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.09.032

Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Santos RL (2009) Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 160: 55–59. doi: 10.1016/j.vetpar. 2008.10.079

Silva KLO, Andrade MMC, Melo LM, Perosso J, Vasconcelos RO, Munari DP, Lima VMF (2014) CD4+FOXP3+ cells produce IL-10 in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 202: 313–318. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.010

Solano-Galllego L (2011) Sistema reprodutivo. In: Raskin RE, Meyer DJ (eds) *Citologia Clínica de Cães e Gatos*. Rio de Janeiro, Elsevier, pp. 274-309

Sugiura K, Nishikawa M, Ishiguro K, Tajima T, Inaba M, Torii R, Hatoya S, Wijewardana V, Kumagai D, Tamada H, Sawada T, Ikehara S, Inaba T (2004) Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology* 209: 619–627. doi: 10.1016/j.imbio.2004.09.003

Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Palkovics T, Papp O, Varga P (2005) Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy* 89: 118-125. doi: 10.1159/000087953

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RME, Gonçalves R, Melo MN, Michalick MSM, Tafuri WL (2004) An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 292: 17-23. doi: 10.1016/j.jim.2004.05.009

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas-Neto AG (2003) *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. Manole, São Paulo

Turchetti AP, Souza TD, Paixão TA, Santos RL (2014) Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 8: 403-407. doi: 10.3855/jidc.4108

Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH (2006) Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* 135: 195–201. doi: 10.1017/S0950268806006881

WHO (2010) Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. IOP Publishing PhysicsWeb. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>. Acessado em 14 de Junho de 2020

Wu R, Van der Hoek K, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL (2004) Macrophage contributions to ovarian function. *Human Reproduction Update* 10(2): 119±133. doi: 10.1093/humupd/dmh011