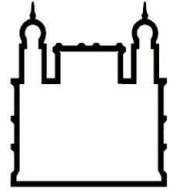




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**TESE DE DOUTORADO**

**PATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:  
Ênfase no Significado da Resposta Inflamatória Granulomatosa no Fígado**

**ISADORA DOS SANTOS LIMA**

**Salvador – Bahia  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**PATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:  
Ênfase no significado da resposta inflamatória granulomatosa no fígado**

**ISADORA DOS SANTOS LIMA**

Orientador: Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

Co-orientador: Washington Luís Conrado dos Santos

Tese apresentada Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia  
2017**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

L732p Lima, Isadora dos Santos  
Patologia da Leishmaniose Visceral Canina: ênfase no significado da resposta  
inflamatória granulomatosa no fígado. / Isadora dos Santos Lima. - 2017.  
101 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, Laboratório  
de Patologia e Biointervenção.

Tese (Doutorado em Patologia) –Universidade Federal da Bahia, Faculdade  
de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Fígado. 3. Histopatologia. 4. Patologia. 5.  
Inflamação. 6. Granulomas. I. Título.

CDU 616.993.161

Título da Tese: "PATOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ÊNFASE NO SIGNIFICADO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA GRANULOMATOSA NO FÍGADO"

ISADORA DOS SANTOS LIMA

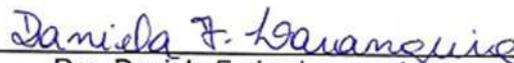
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 27 de setembro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Francisco Javier Salguero Bodes  
Professor Patologia  
FHMS



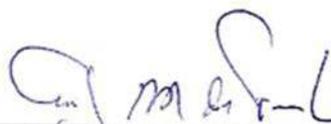
Dra. Daniela Farias Laranjeira  
Pesquisadora Titular  
IGM/Fiocruz



Dra. Claudia Ida Brodskyn  
Pesquisadora Titular  
IGM/Fiocruz



Dra. Karine Araújo Damasceno  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz



Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas  
Pesquisador Titular  
IGM/Fiocruz

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, Isa e Ricardo, que sempre me apoiaram incondicionalmente, mesmo nos momentos difíceis que existiram durante esse período. Eles me deram força para superar as dificuldades, manter o equilíbrio e seguir em frente, mesmo quando pareceu impossível. Eles fazem tudo valer a pena.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, que tem sido um verdadeiro orientador, no real sentido da palavra. Obrigada pelos ensinamentos, não só no campo da patologia, mas como ser humano. O senhor é um modelo a ser seguido, e tenho muito orgulho e honra em ser sua aluna.

Ao meu co-orientador, Dr. Washington Luís Conrado dos Santos, pelos anos de orientação desde a iniciação científica. Não teria chegado a este momento sem a sua contribuição.

Ao meu orientador na Inglaterra, Dr. Javier Salguero, não só por aceitar colaborar conosco no projeto, mas pelo seu papel fundamental como orientador. Sempre presente, bem-humorado e disposto a ajudar no que fosse necessário. Nunca poderei agradecer o suficiente.

A todo o grupo WLCS, em especial Jonathan e Yuri pelo companheirismo, risadas e bons momentos vividos.

À Caroline Vilas Boas, pela amizade, companhia de tantas horas no laboratório, conversas sobre rock, parceria em experimentos e tantos outros momentos.

À Micely Del'Rei Hermida, nossa "mãezona" no grupo, sempre ajudando em tudo que pode, contribuindo com ideias, análises, e sua amizade.

A Valter dos Anjos Almeida, amigo fantástico, um verdadeiro irmão no laboratório e na vida. Obrigada pela ajuda, desde a graduação, em experimentos, idas a campo, aulas, e tudo mais que precisei.

Aos amigos do LPBI, em especial Deborah Fraga, Manuela Solcá e Bruna Macedo, pela colaboração na obtenção de animais para o estudo, ajuda sem a qual não seria possível a realização do trabalho. Aos técnicos Lívia e Sérgio, à Patrícia, da secretaria, pela ajuda em diversos momentos.

À Daniela, professora que me mostrou o mundo acadêmico e sempre me incentivou, uma das principais responsáveis por chegar a este momento.

Ao Dr. Ricardo Riccio, pela ajuda com o trabalho estatístico.

Aos amigos que, mesmo que indiretamente, sempre estiveram presentes. Obrigada a Laura, Gabriel, Labene, Mariana (*in memoriam*).

À Coordenação do curso PGPAT Fiocruz / UFBA.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto Gonçalo Moniz, pela ajuda durante esses sete anos.

À Universidade de Surrey, em especial a Duncan, Emily e Ella, pela enorme ajuda nos procedimentos de imunohistoquímica. A Chris Fellows, Barbara Bacci e Martha Betson, pela orientação em diversos momentos. Obrigada também a Waldo, pelo companheirismo no laboratório durante o meu período em Surrey.

À Capes pela bolsa de mestrado que ajudou na realização deste projeto, e ao CNPQ, pelo apoio financeiro para a realização do doutorado sanduíche, uma experiência de valor imensurável.

À Fiocruz e ao CPqGM, pela infraestrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos.

LIMA, Isadora dos Santos. Patologia da Leishmaniose Visceral Canina: Ênfase no significado da resposta inflamatória granulomatosa no fígado. 101 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:** O fígado está entre os principais órgãos afetados pela leishmaniose visceral canina. Dentre as alterações hepáticas descritas na literatura, destaca-se o granuloma como uma das alterações histopatológicas mais frequentes e de maior importância, uma vez que estudos apontam a relação direta entre aumento na carga parasitária e redução na formação e maturação de granulomas, bem como entre a resolução da infecção e a formação e maturação de granulomas no fígado de camundongos. **RESULTADOS:** Neste estudo mostramos que animais com infecção ativa por *Leishmania sp.* apresentam maior frequência de alterações inflamatórias no fígado. Essas alterações têm correlação, também com a gravidade das manifestações clínicas e com o grau de desorganização da polpa branca do baço, o que reforça seu significado. Além disso, mostramos que existe uma associação entre as alterações inflamatórias e as alterações hematológicas e bioquímicas avaliadas. Observamos, ainda, uma associação entre a intensidade dessas alterações inflamatórias e a carga parasitária no baço dos animais. Vale ressaltar que, enquanto alterações como inflamação portal e perivascular e presença de granulomas em maior quantidade estão relacionadas com maior carga parasitária, o inverso é verificado em relação à linfocitose intrassinusoidal, formação de agregados intrassinusoidais de células inflamatórias mononucleares e hipertrofia de células de Kupffer, sugerindo uma relação entre essas alterações e uma resposta de controle do parasitismo por parte do hospedeiro. Em relação ao estudo dos granulomas, nossos dados mostram que granulomas pequenos possuem uma maior proporção de células TCD3+, enquanto que granulomas médios têm maior proporção de macrófagos MAC387+. Além disso, animais com baço desorganizado têm granulomas com uma maior proporção de células TCD4+ e macrófagos CD163+. Mostramos também que granulomas médios expressam mais TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  do que granulomas pequenos, e que existe uma correlação positiva entre a quantidade de parasitas no granuloma e a expressão de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . No que se refere à resposta humoral, mostramos que cães com mais granulomas produzem mais IgA, IgE, IgG total, IgG 1 e IgG 2. **CONCLUSÕES:** Em conjunto, nossos dados sugerem que a leishmaniose visceral canina leva ao surgimento de alterações histológicas no fígado que refletem o quadro clínico do animal.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral, Fígado, Histopatologia, Patologia, Inflamação, Granulomas, Perfil Imunológico.

LIMA, Isadora dos Santos. Pathology of Canine Visceral Leishmaniasis: Emphasis on the meaning of granulomatous inflammatory response in the liver. 101 f. il. Thesis (Doctoral in Pathology) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** The liver is among the major organs affected by canine visceral leishmaniasis. Among the liver changes described in the literature, granuloma stands out as one of the most frequent and most important histopathological alterations. Studies indicate the direct relation between increase in parasitic load and reduction in the formation and maturation of granulomas, as well as between the resolution of infection and the formation and maturation of granulomas in the liver of mice.

**RESULTS:** In this study, we showed that animals with active infection by *Leishmania sp.* have a higher frequency of inflammatory changes in the liver. These changes have a correlation, also with the severity of the clinical manifestations and with the degree of disorganization of the splenic white pulp, which reinforces their meaning. In addition, we have shown that there is an association between the inflammatory histopathological alterations and the hematological and biochemical alterations evaluated. We also showed an association between the intensity of these inflammatory changes and the parasitic load on the animals' spleens. It is noteworthy that, while changes such as portal and perivascular inflammation and the presence of granulomas in larger amounts are related to higher parasitic load, the inverse is verified in relation to intrasinusoidal lymphocytosis, formation of intrasinusoidal aggregates of inflammatory cells and hypertrophy of Kupffer cells. This suggests a relationship between these changes and a control response of parasitism on the part of the host. Regarding the study of granulomas, our data show that small granulomas have a higher proportion of CD3 + T cells, while medium size granulomas have a higher proportion of MAC387 + macrophages. In addition, animals with disorganized spleens have granulomas with a higher proportion of CD4 + T cells and CD163 + macrophages. We also show that medium size granulomas express more TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  than small granulomas, and that there is a positive correlation between the amount of parasites in the granuloma and the expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . Regarding the humoral response, we showed that dogs with more granulomas produce more IgA, IgE, total IgG, IgG 1 and IgG 2.

**CONCLUSIONS:** Together, our data suggest that canine visceral leishmaniasis leads to the emergence of histological alterations in the liver that reflect the clinical picture of the animal.

**Keywords:** Visceral Leishmaniasis, Liver Histopathology, Pathology, Inflammation, Granulomas, Immune Profile.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*..... 44
- Figura 2.** Escore de alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*..... 45
- Figura 3.** Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com diferentes manifestações clínicas..... 46
- Figura 4.** Escore de alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com diferentes manifestações clínicas..... 48
- Figura 5.** Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com diferentes graus de organização da polpa branca esplênica..... 54
- Figura 6.** Escore de alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com diferentes graus de organização da polpa branca esplênica..... 56
- Figura 7:** Associação entre alterações histológicas em fígado e parasitismo esplênico..... 57
- Figura 8:** Avaliação da presença de parasitos no fígado..... 59
- Figura 9:** Alterações histológicas no fígado dos animais utilizados na avaliação dos granulomas..... 70
- Figura 10:** Granulomas em fígado de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados..... 72
- Figura 11:** Composição dos granulomas com relação ao tamanho e frequência de granulomas intrassinusoidais.....73
- Figura 12:** Composição dos granulomas com relação à organização da polpa branca esplênica..... 74

<b>Figura 13:</b> Associação entre tamanho de granulomas e expressão de citocinas .....	75
<b>Figura 14:</b> Correlação entre presença de <i>Leishmania</i> nos granulomas e expressão de citocinas.....	76
<b>Figura 15:</b> Perfil de imunoglobulinas com relação à frequência de granulomas intrassinusoidais.....	77
<b>Figura 16:</b> Correlação entre produção de imunoglobulinas e a média de granulomas intrassinusoidais por amostra.....	78
<b>Figura 17:</b> Correlação entre produção de imunoglobulinas e o número de granulomas intrassinusoidais por mm <sup>2</sup> .....	79
<b>Figura 18:</b> Perfil de imunoglobulinas com relação à organização da polpa branca esplênica e classificação clínica.....	80
<b>Figura 19:</b> Perfis de resposta no fígado de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados.....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características gerais da amostra.....	43
<b>Tabela 2.</b> Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por <i>Leishmania</i> , com relação às manifestações clínicas.....	47
<b>Tabela 3.</b> Associação entre alterações histológicas em fígado e alterações hematológicas.....	50
<b>Tabela 4.</b> Associação entre alterações histológicas em fígado e alterações bioquímicas.....	51
<b>Tabela 5.</b> Associação entre alterações histológicas em fígado e alterações bioquímicas.....	52
<b>Tabela 6.</b> Associação entre alterações histológicas em fígado e alterações bioquímicas.....	53
<b>Tabela 7.</b> Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por <i>Leishmania</i> , com relação à organização da polpa branca esplênica.....	55
<b>Tabela 8.</b> Detalhes do procedimento de imunoistoquímica.....	64
<b>Tabela 9.</b> Sequências dos primers usados no qPCR.....	66
<b>Tabela 10.</b> Detalhes do procedimento de ELISA.....	67
<b>Tabela 11.</b> Características gerais dos animais utilizados na avaliação dos granulomas.....	68
<b>Tabela 12.</b> Alterações histológicas no fígado dos animais utilizados na avaliação dos granulomas.....	71
<b>Quadro 1.</b> Parâmetros clínicos utilizados no cálculo do escore clínicos dos animais coletados em Camaçari no ano de 2015.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CD</b>	Nomenclatura sistematizada de moléculas (do inglês cluster differentiation)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)
<b>DPX</b>	Distyrene Plasticizer Xylene (meio de montagem de lâminas para histologia)
<b>ELISA</b>	Ensaio imuno enzimático. (do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
<b>FFPE</b>	Tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (do inglês Formalin-fixed, Paraffin-embedded)
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>IFN <math>\gamma</math></b>	Interferon gama (Citocina)
<b>Ig</b>	Imunoglobulinas
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LCM</b>	Microdissecção a laser (do inglês Laser Capture Microdissection)
<b>LST</b>	Intradermorreação de Montenegro (do inglês Leishmanin Skin Test)
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LVC</b>	Leishmaniose Visceral Canina
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato (do inglês Phosphate buffered saline)
<b>PCR</b>	Reação da Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
<b>PIEJ</b>	Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribossomal (do inglês ribosomal Ribonucleic Acid)
<b>RT - PCR</b>	Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase
<b>T.A</b>	Temperatura Ambiente
<b>TBS</b>	Salina tamponada com Tris (do inglês Tris buffered saline)
<b>TGF <math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento $\beta$ (do inglês Transforming growth factor $\beta$ )
<b>TGO</b>	Transaminase glutâmico-oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase glutâmico pirúvica
<b>Th1</b>	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês T helper-1)
<b>Th2</b>	Linfócitos T auxiliares tipo 2 (do inglês T helper-2)
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral (do inglês Tumoral Necrosis Factor)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL .....	14
2.1.1	<b>Transmissão e ciclo de vida</b> .....	14
2.1.2	<b>Epidemiologia</b> .....	16
2.1.3	<b>Manifestações clínicas</b> .....	18
2.1.4	<b>Diagnóstico da LV</b> .....	20
2.1.5	<b>O cão como reservatório e modelo de estudo da leishmaniose visceral</b> .....	22
2.2	O FÍGADO.....	25
2.3	O FÍGADO NA LEISHMANIOSE VISCERAL .....	28
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM FÍGADO DE CÃES DE UMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL</b> .....	<b>35</b>
5.1	METODOLOGIA.....	35
5.1.1	<b>Animais</b> .....	35
5.1.2	<b>Exame clínico</b> .....	36
5.1.3	<b>Evidências de infecção por <i>Leishmania</i></b> .....	37
5.1.3.1	<i>ELISA</i> .....	37
5.1.3.2	<i>Cultura</i> .....	38
5.1.3.3	<i>PCR quantitativo (Real time PCR)</i> .....	38
5.1.4	<b>Exame histológico</b> .....	39
5.1.5	<b>Imunoistoquímica anti <i>Leishmania</i></b> .....	40
5.1.6	<b>Análise e expressão dos resultados</b> .....	41
5.2	RESULTADOS .....	42
5.2.1	<b>Características gerais da amostra</b> .....	42
5.2.2	<b>Alterações histológicas no fígado em relação à presença de infecção ativa</b> ...	43
5.2.3	<b>Associação entre alterações histológicas e manifestações clínicas</b> .....	45
5.2.4	<b>Associação entre alterações histológicas no fígado e alterações laboratoriais</b> .....	49
5.2.5	<b>Associação entre alterações histológicas e organização da polpa branca esplênica</b> .....	54
5.2.6	<b>Associação entre alterações histológicas no fígado e carga parasitária no baço</b> .....	56
5.2.7	<b>Avaliação de parasitismo no fígado</b> .....	58

<b>6</b>	<b>ESTUDO DETALHADO DOS GRANULOMAS EM FÍGADO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE INFECTADOS</b> .....	60
5.1	METODOLOGIA .....	60
6.1.1	<b>Animais</b> .....	60
6.1.2	<b>Exame clínico</b> .....	61
6.1.3	<b>Exame histológico</b> .....	62
6.1.3.1	<i>Classificação dos granulomas</i> .....	62
6.1.4	<b>Imunoistoquímica (IHQ)</b> .....	63
6.1.5	<b>Morfometria</b> .....	65
6.1.6	<b>Microdissecção por captura a laser (LCM)</b> .....	65
6.1.7	<b>Extração de RNA e PCR em tempo real</b> .....	66
6.1.8	<b>Determinação do perfil de imunoglobulinas</b> .....	67
6.1.9	<b>Análise e expressão dos resultados</b> .....	67
6.2	<b>RESULTADOS</b> .....	68
6.2.1	<b>Características gerais da amostra utilizada na avaliação dos granulomas hepáticos</b> .....	68
6.2.2	<b>Alterações histológicas no fígado dos animais utilizados na avaliação dos granulomas hepáticos</b> .....	69
6.2.3	<b>Fenótipo das células presentes nos granulomas hepáticos</b> .....	71
6.2.3.1	<i>Composição celular dos granulomas hepáticos com relação ao tamanho e frequência de granulomas intrassinusoidais</i> .....	71
6.2.3.2	<i>Composição celular dos granulomas hepáticos com relação à organização da polpa branca esplênica</i> .....	74
6.2.4	<b>Perfil de citocinas expressas nos granulomas</b> .....	75
6.2.4.1	<i>Associação entre tamanho de granulomas e expressão de citocinas</i> .....	75
6.2.4.2	<i>Correlação entre presença de Leishmania nos granulomas e expressão de citocinas</i> .....	76
6.2.5	<b>Perfil de Imunoglobulinas</b> .....	77
6.2.5.1	<i>Perfil de imunoglobulinas com relação a frequência de granulomas intrassinusoidais</i> .....	77
6.2.5.2	<i>Correlação entre produção de imunoglobulinas e frequência de granulomas intrassinusoidais</i> .....	78
6.2.5.3	<i>Perfil de imunoglobulinas com relação ao status clínico, organização dos granulomas e à organização da polpa branca esplênica</i> .....	80
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	81
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	90
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose com alta prevalência e ampla distribuição pelo mundo, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (anteriormente conhecida como *Leishmania chagasi*) (BRASIL, 2017; HARHAY, 2011). O cão é considerado o principal reservatório da LV, pois além de albergar os parasitos na pele, o que facilita a infecção de flebótomos, tem uma relação próxima com os humanos (de QUEIROZ, 2011; DANTAS-TORRES, 2007). Além da importância do cão na epidemiologia da infecção, o estudo da doença canina pode contribuir para a compreensão da doença humana, uma vez que o quadro clínico, as alterações histopatológicas e a evolução da leishmaniose visceral canina têm semelhanças com a doença humana (CIARAMELLA, 1997; MENDONÇA, 1999; GUERRA, 2009; DE ABREU, 2011).

Dentre os órgãos mais afetados na doença, destaca-se o fígado, um órgão rico em células do sistema fagocítico mononuclear, localizado na encruzilhada de importantes vias metabólicas e vasculares. Em modelos murinos, estudos têm demonstrado que o controle da infecção no fígado está relacionado com o padrão da resposta inflamatória, sobretudo com a formação de granulomas (ENGWERDA e KAYE, 2000; STANLEY e ENGWERDA, 2007).

Em seres humanos também, diferentes padrões de resposta inflamatória no fígado parecem estar associados a susceptibilidade ou resistência. Em pacientes sintomáticos e naqueles que morreram por causa da LV as alterações observadas no fígado incluem hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer, parasitismo variável dessas células e de macrófagos em espaços porta, infiltrado inflamatório mononuclear portal, focos de infiltrado mononuclear intralobular, balonização de hepatócitos e fibrose pericelular (DUARTE e CORBETT, 1987; EL-HAG, 1994).

Em um raro estudo, Pampiglione e colaboradores, em 1974, no curso de um surto na Itália, biopsiaram fígado de cinco pacientes assintomáticos com LST positivo para antígeno de *Leishmania*. As biópsias apresentaram granulomas epitelióides. A avaliação histológica mostrou nódulos granulomatosos intralobulares variando em número de caso para caso, mas sempre múltiplos, constituídos por acúmulos

arredondados de células epiteliais e histiócitos com linfócitos escassos dentro de uma rede argentofílica fina (PAMPIGLIONE, 1974b). Em estudo do mesmo grupo, foram realizadas necropsias em 9 pacientes que foram a óbito em decorrência de leishmaniose visceral. Foi observado aumento no peso e volume do fígado, com áreas de congestão e degeneração. Microscopicamente, foram observadas extensas áreas de necrose hemorrágica e granulomas intralobulares, consistindo em acúmulos arredondados de células epitelióides, histiócitos, linfócitos, plasmócitos e ocasionalmente, eosinófilos (PAMPIGLIONE, 1974a). Esse perfil de resposta inflamatória foi relacionado com resistência, semelhante ao observado em camundongos não susceptíveis.

Em cães naturalmente infectados são descritas alterações hepáticas semelhantes às observadas em seres humanos. Nos animais sintomáticos as alterações inflamatórias e a hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer, bem como parasitismo, são mais intensos que nos animais assintomáticos ou oligossintomáticos. São descritos também granulomas, de tamanho variável, constituídos por macrófagos (parasitados ou não com amastigotas), algumas células epitelióides, pequeno número de linfócitos, células plasmáticas e raros neutrófilos. Os granulomas raramente eram confluentes e estavam localizados no lúmen de sinusóides (total ou parcial (GIUNCHETTI, 2008; MELO, 2008; MELO, 2009; SANCHEZ, 2004). Sánchez e colaboradores, em 2004, relacionaram a presença de granulomas bem organizados no fígado com uma resposta imune T de memória em animais assintomáticos, diferente dos granulomas desorganizados e intenso parasitismo de células de Kupffer vistos em animais sintomáticos. Reforçam a ideia de que diferentes padrões de resposta inflamatória refletem diferenças na resistência e susceptibilidade. Esses autores não encontraram diferenças nos baços desses dois grupos de animais (SANCHÉZ, 2004).

O baço é outro órgão comprometido no curso da LV. A infecção persistente pode resultar em alterações estruturais profundas, que têm consequências na resposta imune. Estudos realizados por nosso grupo mostraram a ocorrência, de desorganização do tecido linfoide na leishmaniose visceral canina. Há atrofia da polpa branca e intensa plasmocitose da polpa vermelha e essas alterações esplênicas estão relacionadas com maior frequência de cultura esplênica positiva para *Leishmania* e

resultado negativo no LST, indicativos de susceptibilidade (SMELT, 1997; SANTANA, 2008). Além disso, cães com desorganização da polpa branca esplênica têm mais sinais clínicos indicativos da doença, esses sinais são mais intensos, e o estado nutricional é pior (LIMA, 2014). Os achados provavelmente estão relacionados com o fato de o baço ser um órgão chave para o sistema imunológico, e a alteração de sua estrutura possivelmente leve a um comprometimento da resposta imune do hospedeiro, o que leva ao desenvolvimento de doença mais grave nesses animais, com presença de marcadores clínicos e laboratoriais de gravidade da leishmaniose visceral, bem como um maior comprometimento histológico de outros órgãos, como o fígado.

O presente estudo tem como objetivo descrever as alterações hepáticas observadas em uma série de cães com diferentes manifestações clínicas de leishmaniose visceral provenientes de uma área endêmica na Bahia. Descrevemos as alterações histológicas presentes no fígado, que foram correlacionadas com o perfil clínico (apresentação clínica da doença, positividade nos diferentes testes: ELISA, cultura e PCR) e com grau de organização da polpa branca esplênica. Em um outro grupo de cães de área endêmica e positivos para leishmaniose visceral, avaliamos o perfil de citocinas em células dos granulomas presentes no fígado levando em consideração citocinas de interesse no contexto da leishmaniose visceral como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-12. Além disso, realizamos a imunofenotipagem das células desses granulomas e avaliamos a presença de parasitos afim de avaliar eventuais diferenças entre os granulomas de animais com diferentes perfis clínicos e resposta imune. Foram estabelecidas correlações entre esses parâmetros e a organização da polpa branca do baço e pelo perfil de imunoglobulinas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por cerca de 20 espécies de *Leishmania* transmitidas por, aproximadamente, 30 espécies dos gêneros *Phlebotomus* (velho mundo) e *Lutzomyia* (novo mundo) (DESJEUX, 1996; ASHFORD, 1998).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais grave da leishmaniose devido às frequentes complicações e risco de evoluir para a morte se não tratada. É causada por um protozoário, parasita intracelular obrigatório, da família *Trypanosomatidae*, gênero e subgênero *Leishmania*. Nas Américas, bem como no Mediterrâneo, Oriente Médio, África Ocidental e Ásia Central, a doença é causada pela espécie *Leishmania infantum* (anteriormente denominada *Leishmania chagasi*) enquanto na Índia e restante da África é causada pela *Leishmania donovani* (HARHAY, 2011). Estudos recentes de caracterização molecular mostraram que *L. chagasi* e *L. infantum* são geneticamente indistinguíveis, podendo ser citadas como sinônimos (MAURICIO, STOTHARD e MILES, 2000; KUHLS, 2011). O gênero *Leishmania* inclui aproximadamente 30 protozoários, que parasitam tanto humanos quanto animais. Nem todas as espécies de *Leishmania* têm importância médica, sendo apenas 20 consideradas patogênicas para humanos e apenas 10 foram isoladas em cães (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

#### 2.1.1 Transmissão e ciclo de vida

A *Leishmania* é um parasita bifásico que completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, o vetor flebótomo, que abriga a forma promastigota flagelada extracelular, e um mamífero, no qual a forma amastigota intracelular se desenvolve. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*

(BRASIL, 2006). Dentro do organismo do flebotomíneo, os amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, e após alguns dias, se transformam em promastigotas nectomônadas (BATES, 2007). Ao atingirem a válvula estomodeal do vetor, se diferenciam em promastigotas leptomonas (GOSSAGE, 2003) e, por fim, algumas promastigotas leptomonas se diferenciam em promastigotas metacíclicas (ROGERS, 2004), formas capazes de infectar os hospedeiros mamíferos. Este processo pode durar entre 8 e 20 dias (DESJEUX, 2004). Os flebotomíneos se alimentam do sangue de mamíferos. No momento em que o flebótomo parasitado se alimenta de sangue de um vertebrado, as promastigotas metacíclicas migram do seu trato digestório através da sua probóscide e são inoculados no hospedeiro. Em cães isso ocorre principalmente em áreas de pele com pouco pelo, como a cabeça, focinho, pavilhão auditivo e áreas inguinal e perianal (SOLANO-GALLEGO, 2009).

Dentro dos fagolisossomas dos macrófagos residentes, as promastigotas sobreviventes se diferenciam em amastigotas, se multiplicam e posteriormente infectam outros macrófagos ao redor ou em tecidos distantes após sua disseminação pelo organismo por via sanguínea ou linfática (MURRAY, 2005).

A transmissão pode ocorrer de maneira zoonótica ou antroponótica. Na forma zoonótica, os parasitas (*Leishmania chagasi/Leishmania infantum*) são transmitidos a partir de reservatórios silvestres e animais domésticos (pequenos roedores, cães) através da picada do flebotomíneo fêmea. Também pode ser de caráter antroponótico, quando o parasita (*Leishmania donovani*) é transmitido pelo inseto a partir de um hospedeiro humano infectado (HARHAY, 2011; WHO, 2017a). No Brasil, sua transmissão é feita pela fêmea de insetos do gênero *Lutzomyia*. (DESEJEUX, 2004; UZAIR, 2004; BRASIL, 2014; BRASIL, 2009a; DANTAS-TORRES, 2009). Na Europa, Ásia e África, a transmissão é realizada por insetos do gênero *Phlebotomus*, variando de espécie entre as regiões (DESCOTEAUX e TURCO, 1999).

Os flebotomíneos são presentes principalmente em países tropicais, e são ativos durante os meses relativamente quentes do ano nos países de clima temperado. A atividade de flebotomíneos adultos é crepuscular e noturna, do início da primavera ao fim do outono na bacia do Mediterrâneo e durante todo o ano na América do Sul. Sua gama de atividade é entre 15 e 28 °C, e está sempre associada à alta umidade relativa e ausência de vento ou chuva. Flebotomíneos podem voar distâncias

de 200 m a 2,5 km e podem entrar nas casas durante a noite devido ao seu fototropismo positivo (SOLANO-GALLEGO, 2009). No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira é considerada a principal espécie transmissora da *Leishmania (Leishmania) chagasi*, e é encontrada nas cinco regiões do país, mas a *L. cruzi* também foi incriminada como vetora em uma área específica do estado do Mato Grosso do Sul. São também conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (BRASIL, 2017).

### 2.1.2 Epidemiologia

Inicialmente, a LV era tida como doença de caráter eminentemente rural, porém, mais recentemente vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou um crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano (BRASIL, 2017). Tem ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical. A doença afeta pessoas de menor renda e está associada à falta de recursos financeiros, desnutrição, deslocamento de população, habitação de baixa qualidade, mudanças ambientais como desmatamento, construção de barragens, esquemas de irrigação e urbanização. Estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente (WHO, 2017a).

Em 2015, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Nas Américas, os casos humanos de LV estão presentes em 12 países, no entanto 96% dos casos são relatados no Brasil. Em nível regional a LV está classificada em três cenários epidemiológicos: países com transmissão em expansão (Argentina, Brasil e Paraguai), países com transmissão estável ou controlada (Colômbia e Venezuela) e países com transmissão esporádica (Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia, Guiana e México). Em 2015, foram registrados os primeiros casos autóctones

de LV canina no município de Salto em Uruguai, permanecendo como área enzoótica. No período de 2001 a 2015 foram reportados 52.176 casos humanos de leishmaniose visceral nas Américas (WHO, 2017b).

No Brasil, a LV é considerada um grave problema de saúde pública, tendo em vista a prevalência, expansão geográfica e controle complexo, caro e laborioso e a letalidade, que apresenta crescimento, atingindo 7,8% em 2015, com comparação com 3,2% em 2000 (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2017). O crescimento da LV no Brasil é expressivo, pois em 2015 houve 3.289 casos confirmados da doença no país, com 272 óbitos, enquanto em 1990 o número era de 1.944 casos. É uma doença crônica, sistêmica, que quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (BRASIL, 2017).

Os humanos, reservatórios animais e vetor compartilham o mesmo nicho ecológico, o que contribui para a persistência da doença. Em regiões urbanas o cão (*Canis familiaris*) é apontado como o principal reservatório da LV, devido à sua relação próxima com os humanos (DANTAS-TORRES, 2007), e a características como o fato de desenvolver um intenso parasitismo cutâneo, favorecendo a infecção de flebótomos, mesmo quando assintomáticos (de QUEIROZ, 2011; LAURENTI, 2013). Outro aspecto importante é o fato de que a maioria dos cães permanece assintomática por longos períodos de tempo, o que retarda o diagnóstico e favorece a manutenção do animal infectado na região e a transmissão da LV (ALVAR, 2004; BRASIL, 2014; DINIZ, 2008).

Em razão da sua proximidade com os seres humanos, o cão tem sido apontado como o principal reservatório de *L. infantum* na China, bacia do Mediterrâneo e nas Américas (DANTAS-TORRES, 2007; DINIZ, 2008; FRAGA, 2012). Tem sido relatada a existência de diferenças entre raças. Estudos apontam que cães das raças Cocker e Boxer apresentam um maior risco de infecção quando comparados com animais de outras raças (FRANÇA-SILVA, 2003), enquanto que cães da raça Ibizan Hound são apontados como mais resistentes em relação às outras raças (SOLANO-GALLEGO, 2000). Além disso, cães com pelos curtos estão mais predispostos à infecção do que aqueles com pelos longos, provavelmente pelo fato de nos animais de pelos curtos a pele estar mais exposta e ser mais fácil o acesso do flebótomo (DINIZ, 2008). Outro fato característico importante é o cão apresentar, na maioria das vezes, um intenso

parasitismo cutâneo, o que aumenta a possibilidade de infecção do vetor (de QUEIROZ, 2011).

Tem sido demonstrada uma correlação entre a distribuição espacial de cães positivos e a ocorrência de casos humanos de LV em diversas regiões, o que leva a crer que a infecção humana foi precedida pela infecção canina (DANTAS-TORRES, 2007; DINIZ, 2008; FRAGA, 2012). No ambiente silvestre, são apontados como reservatórios as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2014). Existem também relatos indicando roedores como reservatórios da LV em áreas rurais e periurbanas. Outros animais podem compor o cenário epidemiológico da LV em áreas endêmicas, pois, mesmo com a retirada de todos os cães soropositivos, o ciclo de transmissão da doença ainda pode existir, embora o número de casos humanos tenha diminuído (SILVA, 2001).

### **2.1.3 Manifestações clínicas**

A LV engloba uma ampla variedade de manifestações clínicas, no entanto, pode permanecer assintomática ou subclínica, aguda, subaguda ou se apresentar de forma crônica (HERWALDT, 1999). Em humanos, a doença é caracterizada por episódios irregulares de febre, perda substancial de peso, aumento de baço e fígado e anemia (que pode ser grave). Se a doença não for tratada, a taxa de mortalidade em países em desenvolvimento pode passar de 95% (WHO, 2017a).

A doença no cão é de evolução lenta e início insidioso. A LVC é uma doença sistêmica grave cuja manifestações clínicas são dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado (BRASIL, 2014). No que se refere à apresentação clínica da LVC, os animais podem ter desde nenhum sinal até múltiplos sinais clínicos, e esse polimorfismo reflete não só o estágio da evolução da doença, mas também as diferenças na susceptibilidade do hospedeiro, o estado do sistema imunológico, e terapias prévias. Em algumas regiões, a ocorrência de outras infecções, como erlichiose e babesiose também devem ser consideradas, pois tais

infecções podem levar ao surgimento de sinais clínicos semelhantes (SARIDOMICHELAKIS, 2009; CIARAMELLA, 1997).

A leishmaniose canina é uma doença sistêmica que pode atingir qualquer órgão, tecido ou fluido biológico, e se manifesta por sinais clínicos inespecíficos. Os principais achados clínicos encontrados no exame físico em LV incluem febre, palidez de mucosa, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas, depressão, letargia, atrofia muscular, anorexia, sinais oculares (como ceratoconjuntivite e opacidade de córnea), alopecia, epistaxe, artropatias, ascite, diarreia, onicogribose, manifestações hemorrágicas, além de linfadenomegalia e perda de peso. Também são observados outros sinais como, lesões cutâneas perioculares, falência renal e claudicação (ETTINGER e FELDMAN, 1997; CIARAMELLA, 1997; SOLANO-GALLEGO, 2009; DE ABREU, 2011; MENDONÇA, 1999; MARTINÉZ-SUBIELA, 2002; SOLANO-GALEGO, 2004; UZAIR, 2004; BARROUIN-MELO, 2006; BRASIL, 2014; REIS, 2006a; SANT'ANA, 2007; LIMA, 2010).

As alterações cutâneas mais comuns incluem dermatite esfoliativa não pruriginosa, com ou sem alopecia, que pode ser generalizada ou localizada na face, em particular no espelho nasal, orelhas e membros, dermatite ulcerativa sobre proeminências ósseas, junções mucocutâneas, patas, orelhas, dermatite nodular focal ou multifocal, dermatite proliferativa mucocutânea e dermatite papular. Além disso, costuma ser observada uma opacidade nos pelos. Manifestações cutâneas atípicas como despigmentação, paniculite, hiperqueratose digital e nasal, erupção pustular, doença semelhante à alopecia areata, doença semelhante ao pênfigo folheaceo e eritema multiforme são relativamente raras. Piodermite estafilocócica, superficial ou profunda, é uma complicação comum (BRASIL, 2014; CIARAMELLA, 1997; ETTINGER e FELDMAN, 1997; KOUTINAS, 1999; SANT'ANA, 2007; SOLANO-GALLEGO, 2009).

Os achados laboratoriais mais descritos são anemia, leucopenia, caracterizada por linfopenia, eosinopenia e monocitopenia, trombocitopenia, neutrofilia, hiperproteinemia, principalmente devido à elevada produção de anticorpos, e hipoalbuminemia, devido às lesões renais e hepáticas (ETTINGER e FELDMAN, 1997; CIARAMELLA, 1997; REIS, 2006a; DE ABREU, 2011). As doenças canina e humana apresentam várias semelhanças em relação ao quadro clínico, com exceção

do comprometimento cutâneo mais grave observado na doença canina (MORENO e ALVAR, 2002).

#### **2.1.4 Diagnóstico da LV**

O diagnóstico da LVC é complexo pois, além do amplo espectro de sinais clínicos atribuídos à doença, esses sinais são inespecíficos, sendo compartilhados com uma série de outras doenças, inclusive enfermidades que se desenvolvem juntamente com a LV (co-infecções) (SUNDAR e RAI, 2002). Além disso, as manifestações clínicas estão sujeitas à influência de fatores como diferenças na susceptibilidade do hospedeiro, o estado do sistema imunológico, e terapias prévias (SARIDOMICHELAKIS, 2009; CIARAMELLA, 1997).

O diagnóstico laboratorial da doença canina é semelhante ao realizado na doença humana, podendo ser baseado em técnicas de diagnóstico imunológico, como ELISA, Imunofluorescência Indireta (RIFI), teste cutâneo de leishmanina (LST), entre outros (UZAIR, 2004; BRASIL, 2014). São utilizadas também técnicas de diagnóstico parasitológico, como punção aspirativa esplênica, aspirado de medula óssea, biópsia hepática e a aspiração de linfonodos, a partir das quais o material pode passar por exame direto ou isolamento do parasito em meio de cultura e isolamento pela inoculação em animais susceptíveis (QUEIROZ, 2004; UZAIR, 2004; BRASIL, 2006). Outro método de grande importância no diagnóstico da leishmaniose visceral é a PCR (polymerase chain reaction), método molecular que apresenta alta sensibilidade (BRASIL, 2006) e especificidade diagnóstica (MATHIS, 1995; BELLI, 1998; REALE, 1999).

Os procedimentos imunológicos têm sido empregados para triagem e para o diagnóstico definitivo de diversas doenças parasitológicas por causa de sua facilidade e precisão. Para leishmanioses, esses métodos são amplamente aplicados (BRASIL, 2014). No entanto, limitações importantes podem levar a interpretação diagnóstica incorreta como reações cruzadas, especialmente com espécies filogeneticamente muito relacionadas e perda de precisão em pacientes imunossuprimidos.

O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura in vitro. O teste ELISA tem o seu resultado expresso em unidades de absorvância a um raio de luz, em uma reação com diluições fixas ou mais comumente, apenas como reagente ou não. A RIFI tem sido muito utilizada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias, podendo apresentar reações cruzadas principalmente com a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e a doença de Chagas (BRASIL, 2014). A RIFI consiste na reação inicial de soros com parasitas (*Leishmania*), fixados em lâminas de microscopia para fluorescência. É utilizado um conjugado fluorescente ligado a imunoglobulina anti-IgG humana ou canina, de acordo com o soro utilizado. São considerados positivos todos os soros que apresentarem reatividade a partir da diluição 1:80. Caso o soro seja reagente somente na diluição de 1:40 uma nova amostra deverá ser solicitada após 30 dias (BRASIL, 2014).

O leishmanin skin test (LST) também é utilizado para detectar a infecção e a resposta imune à *Leishmania* em cães. O resultado positivo no LST indica que o animal produz uma resposta celular quando em contato com o antígeno da *Leishmania*, e tendo em vista que a imunidade ao parasita é mediada por células T, uma resposta celular positiva pode indicar um perfil de resistência à infecção (PINELLI, 1994; SOLANO-GALLEGO et al, 2000). No entanto, há controvérsias consideráveis sobre o uso de LST em cães. Por exemplo, não há uma definição clara sobre a dose de antígeno, e o local da injeção varia entre os estudos (CARDOSO, 2007; DANESHVAR, 2010; GÓMEZ-OCHOA, 2009; RODRÍGUEZ-CORTÉS, 2007).

O diagnóstico parasitológico continua sendo o padrão ouro por causa de sua alta especificidade (HERWALDT, 1999), e se baseia na demonstração do parasito obtido de material biológico de punções hepática, esplênica, de linfonodos, de medula óssea e biópsia ou escarificação de pele. Entretanto, alguns desses procedimentos, embora ofereçam a vantagem da simplicidade, são métodos invasivos, significando a ocorrência de riscos para o animal e também impraticáveis em programas de saúde pública, em que um grande número de animais deva ser avaliado em curto espaço de tempo. A especificidade do método é de aproximadamente 100% (BRASIL, 2014). No entanto, a sensibilidade varia consideravelmente, uma vez que a precisão do exame microscópico é influenciada pela qualidade da amostra, pela capacidade técnica do

examinador e pela qualidade dos reagentes utilizados nos procedimentos, além da heterogeneidade de distribuição dos parasitos (HERWALDT, 1999; CHAPPUIS, 2007; REITHINGER DUJARDIN, 2007).

### **2.1.5 O cão como reservatório e modelo de estudo da leishmaniose visceral**

Além da importância do cão como reservatório, a doença canina também é tida como de valor para a compreensão da doença humana, uma vez que o quadro clínico apresentado na doença canina, como mencionado acima, apresenta semelhanças com o quadro observado na doença humana, com exceção do comprometimento cutâneo observado na doença canina, que é mais exacerbado do que o observado na doença humana. Além disso, a história natural da doença canina apresenta muitas semelhanças com a doença humana, o que faz com que a LV canina seja um importante modelo de estudo para a LV humana (CIARAMELLA, 1997; MENDONÇA, 1999; GUERRA, 2009; DE ABREU, 2011).

A resposta imune tipo Th1, é exibida por indivíduos que desenvolvem a forma assintomática da LV (PINELLI, 1994). Se após a infecção, linfócitos T CD4+ do tipo Th1 são estimulados, ocorre a produção predominante de IFN- $\gamma$ , com consequente ativação de macrófagos e destruição do parasita (MURRAY, 1983). Já os indivíduos que desenvolvem a doença tendem a apresentar uma resposta imune do tipo Th2 ou a predominância da atividade de citocinas produzidas por células T CD4+ Th2 (GHALIB, 1993). Neste tipo de resposta, ocorre uma predominância da produção de IL-10 e IL-4. A produção de IFN- $\gamma$  é regulada por diversos fatores na leishmaniose visceral, dentre eles a IL-10, que possui um papel fundamental na supressão dessa citocina (BACELLAR, 2000).

Contudo, existe um equilíbrio entre essas respostas, como observado por Singh e colaboradores (2012), que mostraram que tanto pacientes com leishmaniose visceral ativa quanto pacientes clinicamente curados apresentavam níveis elevados de IFN- $\gamma$ , porém apenas pacientes com doença ativa também produziram IL-10. Isso mostra a presença dos dois tipos de resposta (SINGH, 2012). Esses dados apontam

a IL-10 como um possível alvo para a imunoterapia contra a LV, pois a sua inibição poderia levar a um predomínio de resposta imune do tipo TH1, o que favoreceria a eliminação do parasita. Ao inibir a IL-10, o equilíbrio entre as citocinas efetoras e reguladoras pode ser deslocado para uma resposta do tipo TH1. O bloqueio de IL-10 pode aumentar o bloqueio da função de células apresentadoras de antígenos e, além disso, aumentar a capacidade do macrófago infectado de responder adequadamente a IFN- $\gamma$ , promovendo assim a eliminação de parasita, tal como demonstrado *in vitro* (GAUTAM, 2011; KUMAR e NYLÉN, 2012).

Isto pode reduzir a dose e/ou a duração do tratamento que os pacientes recebem. Outros alvos potenciais podem ser receptores expressos em Treg ou os seus ligantes correspondentes em células efetoras, tais como a PD-1, e seus ligantes PD1-L (B7-H1) ou CTLA-4 (EL-ON, 2009; KUMAR e NYLÉN, 2012). A supressão de outras citocinas, incluindo de IL-13, IL-4 e TGF- $\beta$ , inibiu a replicação do parasita, mas apenas afetou parcialmente a morte do parasita sem a indução de um efeito sinérgico com antimoniais pentavalentes (MURRAY et al, 2005).

Outro aspecto importante a ser observado é a diversidade de possíveis apresentações que é observada na doença canina. Como já foi mencionado anteriormente, os cães infectados podem apresentar desde nenhum sinal clínico, sendo esses animais chamados de assintomáticos, até um elevado número de sinais, sendo considerados polissintomáticos. Devido a esse polimorfismo, tem sido buscada a identificação de possíveis marcadores de gravidade para a doença, a fim de definir o perfil dos animais resistentes e dos animais susceptíveis a leishmaniose visceral. Até o momento, alguns parâmetros têm sido utilizados como marcadores de susceptibilidade e resistência, como a presença de parasitas em linfonodos e outros órgãos, como o baço, determinada através de cultura.

A identificação do parasito em cultura de tecidos do hospedeiro indica uma incapacidade deste de controlar a proliferação da *Leishmania* no organismo, e consequentemente, de controlar a infecção (PINELLI, 1994; PARANHOS-SILVA, 2003; REIS, 2006b). Um importante marcador de resistência ou susceptibilidade a leishmaniose visceral é o resultado no teste cutâneo da leishmanina (LST). O resultado positivo no LST indica que o animal produz uma resposta celular quando em contato com o antígeno da *Leishmania*, e tendo em vista que a imunidade ao parasita

é mediada por células T, uma resposta celular positiva pode indicar um perfil de resistência à infecção (PINELLI, 1994; SOLANO-GALLEGO, 2000). A resposta linfoproliferativa in vitro também é um importante marcador, bem como o perfil de citocinas produzidas pelos animais durante a infecção (PINELLI, 1994). A presença de resposta linfoproliferativa e a produção de citocinas como IFN- $\gamma$  indica um perfil de resistência à infecção (PINELLI, 1994; PARANHOS-SILVA, 2003; MURRAY, 1983).

A presença de sinais clínicos também é um marcador importante. Animais com perfil de resistência à infecção tendem a permanecer assintomáticos por longos períodos, podendo nunca vir a apresentar sinais de doença, ao passo que animais susceptíveis apresentam uma série de sinais clínicos. Contudo, a grande variedade e inespecificidade dos sinais clínicos atribuídos à LV dificulta a avaliação (PINELLI, 1994; PARANHOS-SILVA, 2003; SOLANOGALLEGO, 2000).

Outro aspecto a ser avaliado é a produção de anticorpos específicos. Foi demonstrado que animais assintomáticos produzem IgG1 em maiores quantidades, enquanto que animais sintomáticos produzem mais IgA, IgE e IgG2. Também foi observado que animais com maiores níveis de IgG1 apresentam menor carga parasitária na medula enquanto que animais com maiores níveis de IgA, IgM e IgG2 apresentam maior carga parasitária em órgãos como pele, medula óssea, linfonodo e baço (REIS, 2006b).

Nosso grupo demonstrou que existe uma associação entre a presença de marcadores de gravidade e a desestruturação do tecido linfoide esplênico observada na LV. Animais com parasitismo esplênico identificado em cultura e resultado negativo no LST apresentaram mais frequentemente desestruturação do tecido linfoide esplênico do que aqueles animais que não apresentavam parasitismo esplênico e tiveram resultado positivo no LST (SANTANA, 2008; SILVA, 2012). Esses achados, juntamente com o fato de o baço ser um órgão altamente parasitado nos animais com perfil de susceptibilidade para a LV (REIS, 2006b), mostram que o baço é um órgão de grande importância no contexto da LV.

## 2.2 O FÍGADO

O fígado é o maior órgão interno do corpo. Em carnívoros adultos pesa o equivalente a de 3% a 4% do peso corporal. Em animais monogástricos, ele está em contato direto com o diafragma e ocupa a área central do abdômen cranial. O fígado em cães e gatos está bem dividido por fissuras que se estendem da margem ventral, formando vários lobos, cujo número e tamanho variam entre as espécies. O fígado é revestido por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo que se torna mais espessa no hilo, por onde a veia porta e a artéria hepática penetram o fígado e por onde saem os ductos biliares hepáticos direito e esquerdo, bem como os linfáticos (DYCE, 2004; JUNQUEIRA, 2013; MCGAVIN e ZACHARY, 2012).

Na concepção do lóbulo hepático de Kiernan, o fígado exhibe repetidas unidades hexagonais chamadas lóbulos hepáticos. No centro de cada lóbulo está a veia central, a partir da qual irradiam placas de células hepáticas, chamadas hepatócitos, e sinusóides em direção à periferia. Uma veia central está localizada no centro do lóbulo. Os ramos da veia porta, da artéria hepática, do ducto biliar e dos vasos linfáticos estão localizados na periferia do lóbulo nos tratos portais (espaço porta). Placas de hepatócitos dispostas radialmente no espaço entre os espaços porta e a veia central. O espaço porta normalmente contém a artéria hepática, o ducto biliar, a veia porta e vários vasos linfáticos. Essas estruturas são cercadas por uma matriz extracelular colágena que forma uma borda abrupta com uma fila circunferencial de hepatócitos, denominada placa limitadora (EROSCHENKO, 2013; JUNQUEIRA, 2013; MCGAVIN e ZACHARY, 2012).

O componente celular básico do fígado é o hepatócito, uma célula epitelial. Estas células estão agrupadas em trabéculas com uma célula de espessura, interconectadas, separadas por vasos sanguíneos sinusóides através dos quais o sangue flui (JUNQUEIRA, 2013; YOUNG, 2014). Os sinusóides são canais sanguíneos tortuosos e dilatados, revestidos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas que também exibem lâmina basal descontínua. Os sinusóides são separados dos hepatócitos subjacentes por um espaço subendotelial perissinusoidal (espaço de Disse). Como resultado, o material ingerido transportado no sangue sinusoidal tem um acesso direto através da parede endotelial descontínua

com os hepatócitos. A estreita associação de células hepáticas e circulação permite a absorção de nutrientes da digestão, bem como a secreção de produtos no sangue. Além das células endoteliais, os sinusóides hepáticos também contêm macrófagos, chamados células Kupffer, localizados no lado luminal das células endoteliais (EROSCHENKO, 2013; YOUNG, 2014)

O fígado exibe repetidas unidades hexagonais chamadas lóbulos hepáticos. No centro de cada lóbulo está a veia central, a partir da qual irradiam placas de hepatócitos e sinusóides em direção à periferia. Em algumas regiões da periferia dos lóbulos existe tecido conjuntivo contendo ductos biliares, vasos linfáticos, nervos, ramos da artéria hepática e da veia porta hepática. Essas regiões, os espaços porta, são encontradas nos cantos dos lóbulos (EROSCHENKO, 2013; JUNQUEIRA, 2013)

O lóbulo estrutural é organizado em torno de uma veia central e reflete a aparência histológica do fígado. No entanto, uma unidade funcional pode ser definida com o trato portal no centro. Tal organização reflete os gradientes funcionais, isto é, o oxigênio e os nutrientes entregues pelo sangue são mais concentrados perto dos tratos portal, reduzindo progressivamente enquanto os hepatócitos extraem estes materiais do sangue que atravessa os sinusóides para a veia central. Tal organização permite zonas funcionais concêntricas. A zona 1 é a zona mais altamente oxigenada, em torno dos espaços porta. A zona 3 envolve as vénulas centrais e é pobre em oxigênio. A zona 2 é intermediária. Por conveniência, as alterações patológicas no fígado são normalmente designadas em relação ao lóbulo histológico clássico (EROSCHENKO, 2013; JUNQUEIRA, 2013; RUBIN, 2012)

Uma particularidade do fígado é o seu duplo suprimento sanguíneo. A veia porta drena o trato digestório e fornece cerca de 60 a 70% do fluxo sanguíneo hepático aferente, um sangue pouco oxigenado, porém rico em nutrientes. O restante é fornecido pela artéria hepática que deriva do tronco celíaco da aorta abdominal e fornece sangue rico em oxigênio. A principal função do sistema arterial é suprir os hepatócitos com uma quantidade adequada de oxigênio. O sangue flui da periferia para o centro do lóbulo hepático. Conseqüentemente, oxigênio e metabólitos, assim como todas as substâncias absorvidas no intestino, atingem primeiro as células periféricas e posteriormente as células centrais dos lóbulos (JUNQUEIRA, 2013; MCGAVIN e ZACHARY, 2012).

No sentido contrário ao do fluxo sanguíneo ocorre a drenagem biliar. Nos lóbulos hepáticos, a bile flui no canal biliar em direção ao ducto biliar na área portal, enquanto o sangue nos sinusóides flui para a veia central. Como resultado, a bile e o sangue não se misturam. Os hepatócitos secretam a bile, que flui através dos canalículos biliares, ductulos biliares (canais de Hering) e ductos biliares. Essas estruturas se fundem gradualmente, formando uma rede que converge para formar os ductos hepáticos direito e esquerdo, os quais se fundem para formar o ducto hepático que, após receber o ducto cístico proveniente da vesícula biliar, continua até o duodeno como ducto colédoco ou ducto biliar comum (EROSCHENKO, 2013 JUNQUEIRA, 2013).

O fígado executa diversas funções, dentre elas endócrinas e exócrinas. Uma das principais funções exócrinas dos hepatócitos é sintetizar e liberar a bile nos canalículos biliares. A liberação da bile é regulada principalmente por hormônios. O fluxo biliar aumenta quando hormônios, como a colecistoquinina, é liberado pelas células enteroendócrinas mucosas, estimuladas quando as gorduras dietéticas no quimo entram no duodeno. Os sais biliares emulsificam as gorduras no intestino delgado (duodeno). Este processo permite uma digestão mais eficiente das gorduras pelas lipases pancreáticas. Os hepatócitos também excretam bilirrubina, formada no corpo após a degradação de eritrócitos por macrófagos hepáticos, chamados células de Kupffer. A bilirrubina é absorvida do sangue pelos hepatócitos e excretada na bile. Os hepatócitos também têm um papel importante no sistema imunológico. Os anticorpos produzidos pelos plasmócitos na lâmina própria intestinal são retirados do sangue pelos hepatócitos e transportados para o canal biliar e para a bile (EROSCHENKO, 2013; YOUNG, 2014).

Os hepatócitos são também células endócrinas. As funções endócrinas dos hepatócitos envolvem a síntese de numerosas proteínas plasmáticas, incluindo a albumina e os fatores de coagulação, protrombina e fibrinogênio. O fígado também armazena gorduras, várias vitaminas e carboidratos como glicogênio. Quando as células do corpo precisam de glicose, o glicogênio que é armazenado no fígado é convertido de volta em glicose e liberado na corrente sanguínea. Hepatócitos também desintoxicam o sangue de drogas e substâncias durante seu trajeto através dos sinusóides. As células de Kupffer nos sinusóides são fagócitos especializados

derivados de monócitos de sangue. Estas grandes células filtram e fagocitam material particulado, detritos celulares e eritrócitos desgastados ou danificados que fluem através das sinusóides. O fígado também desempenha funções vitais no início da vida. No feto, o fígado é o local de hemopoiese, ou produção de células sanguíneas (EROSCHENKO, 2013; JUNQUEIRA, 2013; YOUNG, 2014).

### 2.3 O FÍGADO NA LEISHMANIOSE VISCERAL

O fígado é um dos principais órgãos afetados na leishmaniose visceral. A imunidade específica do fígado tem sido descrita em vários estudos experimentais em modelos utilizando camundongos, nos quais o fígado é descrito como local de uma infecção de resolução aguda (ENGWERDA, 2000; ENGWERDA, 2004). Estudos em camundongos apontam o fígado como local de melhor controle da carga parasitária (LECLERCQ, 1996), sendo descrita uma associação entre o tamanho dos granulomas formados, a composição celular dos granulomas e a eventual recuperação da infecção (MCEL RATH, 1988). O processo de formação dos granulomas descritos nos modelos experimentais é dependente da produção de quimiocinas, posterior recrutamento de monócitos, neutrófilos, células T CD4+ e células T CD8+, produção de citocinas inflamatórias e ativação de células infectadas (STANLEY e ENGWERDA, 2007; MCEL RATH, 1988; MURRAY, 1999; SQUIRES, 1989; WILSON, 1996; WILSON, 2005).

Em seres humanos, foi descrita a presença de parasitas em células de Kupffer, infiltrado inflamatório mononuclear portal, áreas nodulares dispersas com infiltrado inflamatório constituído por infiltração de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas sem diferenciação epitelióide, infiltrado mononuclear nos sinusóides, hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer, balonização de hepatócitos e fibrose pericelular (EL-HAG, 1994; DUARTE, 2008).

Em estudo pioneiro realizado por Andrade (1958), foram avaliadas necropsias de cinco indivíduos que foram a óbito em decorrência de leishmaniose visceral. Foi descrita a presença de hepatoesplenomegalia, células de Kupffer densamente

parasitadas, por vezes rodeadas por plasmócitos e linfócitos. Em certos trechos há acúmulos celulares distendendo a parede sinusoidal e comprimindo as traves hepáticas. Os espaços porta com denso infiltrado de predominância linfoplasmocitária, podendo conter também alguns histiócitos com parasita no citoplasma. Por vezes eram formadas, em pleno parênquima, reações granulomatosas representadas por infiltração focal histiocitária, com algumas células parasitadas, e plasmócitos de permeio (ANDRADE, 1958).

Pampiglione e colaboradores, em 1974, realizaram biópsias de fígado em 6 indivíduos assintomáticos sorologicamente positivos para leishmaniose. Todas as biópsias apresentaram granulomas epitelióides, com a presença de *Leishmania* identificável em um caso. De modo geral, as alterações histológicas consistiram em nódulos granulomatosos intralobulares variando em número de caso para caso, mas sempre múltiplos, consistindo em acumulações arredondadas de células epiteliais e histiócitos com linfócitos escassos dentro de uma rede argento-fílica fina (PAMPIGLIONE, 1974b).

Em 1988, Moreno e colaboradores examinaram biópsias de fígado provenientes de 3 pacientes sintomáticos e positivos sorologicamente para leishmaniose. Em todos os casos, granulomas intralobulares pequenos, distribuídos ao acaso no parênquima hepático, estavam presentes. Estes granulomas foram formados por histiócitos misturados com linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. Todas as amostras mostraram um material fibrinóide característico, melhor demonstrado pela coloração de tricromio de Masson. Este material era geralmente encontrado dentro dos granulomas, às vezes com um arranjo de anel em torno de um vacúolo vazio central (granulomas de anel de fibrina). O material fibrilar às vezes estava misturado com os componentes celulares do granuloma (granulomas atípicos). Também foi possível identificar material fibrinóide sinusoidal não associado aos granulomas. Estes três arranjos diferentes do material fibrinóide foram encontrados em todos os pacientes (MORENO, 1988).

Em um raro estudo, Pampiglione e colaboradores, em 1974, realizaram necropsia em 9 casos de indivíduos que foram a óbito com diagnóstico de leishmaniose visceral. O fígado apresentava-se aumentado em peso e volume (cerca de um terço mais do que os valores normais), com congestão e algumas alterações

degenerativas como áreas de atrofia vermelha. Microscopicamente, foram observados dois tipos de lesões no fígado, áreas mais ou menos extensas de necrose hemorrágica e formação de nódulos granulomatosos. Os nódulos granulomatosos consistiram de histiócitos com células linfo-granulocíticas, plasmócitos e, ocasionalmente, eosinófilos. Algumas vezes foi detectada uma pequena necrose central nos granulomas. Em outros casos, as áreas necróticas hemorrágicas representaram atrofia vermelha (desaparecimento de hepatócitos, congestão e extravasamento de eritrócitos, colapso reticular) (PAMPIGLIONE, 1974a).

Em 1987, Duarte e Corbett descreveram 3 padrões distintos para as alterações hepáticas em seres humanos com leishmaniose visceral, sendo o primeiro chamado de típico, com hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer, por vezes com parasitas, infiltrado inflamatório portal mononuclear e pequenos focos de infiltrado mononuclear intralobular. O segundo padrão, chamado de nodular, consiste de nódulos intralobulares e portais, com macrófagos, linfócitos e plasmócitos, hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer, poucos parasitas, principalmente em macrófagos no centro dos nódulos, e infiltrado mononuclear portal. O terceiro padrão, chamado de fibrinogênico, apresenta deposição intralobular de matriz conjuntiva (fibrose) (DUARTE e CORBETT, 1987).

Em cães, as alterações observadas consistem na presença de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos) intrassinusoidais, infiltrado inflamatório portal, predominantemente mononuclear, fibrose portal, vacuolização de hepatócitos, hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer, congestão sinusoidal, e presença de granulomas (GONZALÉZ, 1988; BINHAZIM, 1992; OLIVEIRA, 1993; VALLADARES, 1997; SANCHEZ, 2004; RALLIS, 2005; GIUNCHETTI, 2008; MELO, 2008; MELO, 2009; PANGRAZIO, 2009; MICHELIN, 2011; TOPLU, 2011; MAIA E CAMPINO, 2012).

Dentre as alterações descritas, destacam-se os granulomas. A presença de granulomas é uma das alterações histopatológicas mais frequentes observadas em leishmaniose visceral canina (GUTIERREZ, 1984; TAFURI, 1996). Os granulomas são formados por células epitelióides, linfócitos, plasmócitos e raros granulócitos, podendo conter formas amastigotas dos parasitos em macrófagos (TAFURI, 1996). Foi

demonstrado que o aumento no número de granulomas está associado com o aumento da carga parasitária no fígado (GUTIERREZ, 1984).

Trabalhos anteriores descreveram uma relação entre a formação de granulomas, o estado imunológico e a apresentação clínica da doença em cães. Sanchez e colegas, em 2004, observaram que os fígados de cães saudáveis apresentavam imunidade efetiva, com granulomas bem organizados, aprisionando os parasitas no interior e presença de células T efetoras ativadas, enquanto os fígados de cães sintomáticos haviam granulomas desorganizados e ineficaz infiltrado, consistindo em células T e células de Kupffer altamente parasitadas (OLIVEIRA, 1993). No entanto, vários estudos relataram a presença de granulomas no fígado de cães infectados, independentemente do estado clínico do animal (GONZALÉZ, 1988; BINHAZIM, 1992; OLIVEIRA, 1993; GIUNCHETTI, 2008; TAFURI, 1996).

### 3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O cão é apontado como o principal reservatório da LV, devido à sua relação próxima com os humanos (DANTAS-TORRES, 2007), e ao fato de albergar parasitos na pele, favorecendo a infecção de flebótomos (de QUEIROZ, 2011). Há uma correlação entre a distribuição espacial de cães positivos e a ocorrência de casos humanos de LV em diversas regiões, o que leva a crer que a infecção humana é precedida pela infecção canina (DANTAS-TORRES, 2007; DINIZ, 2008, FRAGA, 2012). Outro aspecto a ser observado é o fato de que a doença canina pode servir de modelo para a compreensão da doença humana, uma vez que o quadro clínico apresentado na doença canina guarda semelhanças com a doença humana (CIARAMELLA, 1997; MENDONÇA, 1999; GUERRA, 2009; DE ABREU, 2011).

Além do papel do cão como reservatório e modelo de estudo, a doença canina tem grande importância comercial. Segundo dados divulgados pelo IBGE, existem no Brasil cerca de 50 milhões de cães vivendo como animais de estimação, contra cerca de 22 milhões de gatos. A população de cães de estimação no Brasil é a segunda maior do mundo. Tais números se refletem no crescimento do mercado pet, o segmento do agronegócio relacionado ao desenvolvimento das atividades de criação, produção e comercialização de animais de estimação. O Brasil é o terceiro colocado em relação ao faturamento do mercado pet no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e do Reino Unido. No Brasil, a previsão de faturamento este ano é de 19,2 bilhões de reais, um crescimento aproximado de 7% em relação a 2016. Destaca-se ainda o segmento de saúde animal, com uma previsão de crescimento de 13%, quase o dobro do mercado pet como um todo (ABINPET, 2017).

Esta expansão é explicada pela mudança de comportamento da população brasileira em relação aos cuidados com os seus animais de estimação. Nos últimos anos, os animais de estimação passaram a ter um papel de maior destaque nas famílias. Devido a essa proximidade com os donos, a saúde animal passou a receber maior atenção, com maiores gastos, e conseqüentemente maiores investimentos. Esses fatos evidenciam a importância de compreender enfermidades que acometem os cães, a fim de prevenir e intervir, melhorando a qualidade de vida desses animais.

No trabalho aqui descrito, realizamos um estudo descritivo das alterações presentes no fígado dos cães de área endêmica, avaliando o perfil de citocinas expressas em granulomas presentes no fígado de cães de área endêmica, além da fenotipagem das células desses granulomas por meio de imunistoquímica, afim de avaliar possíveis diferenças entre os granulomas em animais com diferentes perfis clínicos. Também avaliamos o perfil de imunoglobulinas no soro desses animais. Ao final, correlacionamos as características observadas com o perfil clínico dos animais. Com isso, buscamos compreender a relação entre os diferentes perfis de resposta do hospedeiro e a resposta do fígado de cães naturalmente infectados.

A nossa hipótese é de que cães com leishmaniose visceral, a depender do estado do sistema imunológico, apresentam respostas distintas no fígado, com diferentes tipos de granulomas, quanto à organização e à presença de parasitos. Esse estudo faz parte de uma linha de pesquisa mais geral do nosso laboratório, que visa a identificação de marcadores de susceptibilidade e resistência na LV canina que possam ser utilizados na identificação dos diferentes padrões de resposta, além de marcadores da evolução da doença. Pretendemos, através dos dados obtidos, contribuir para uma melhor definição das alterações histológicas relacionadas à leishmaniose visceral canina.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as alterações histológicas no fígado de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados, com diferentes perfis clínicos e imunológicos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever as alterações histológicas em fígado de cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral.

2. Realizar um estudo dos granulomas em fígado, avaliando o perfil de expressão de citocinas relacionadas à resposta protetora ou de susceptibilidade, e a composição fenotípica das células presentes, e a presença de parasitas nos granulomas.

3. Avaliar o padrão de imunoglobulinas produzidas por esses animais, e, juntamente com a organização do baço, delinear um perfil do sistema imunológico desses animais.

4. Fazer a correlação entre as alterações histológicas hepáticas, o perfil clínico (apresentação clínica da doença, positividade nos diferentes testes: ELISA, cultura, PCR) e o perfil do sistema imunológico dos cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral.

## 5. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM FÍGADO DE CÃES DE UMA ÁREA ENDÊMICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

### 5.1 METODOLOGIA

#### 5.1.1 Animais

As amostras e dados clínicos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de 148 cães capturados em Jequié e Camaçari, em colaboração com o Centro de Referência em Doenças Endêmicas Pirajá da Silva (PIEJ), com a Secretaria de Saúde de Jequié, Bahia, e com o Centro de Controle de Zoonoses Camaçari, BA, durante seu inquérito sorológico de rotina, nos anos de 2004, 2006, 2010 e 2012. Os animais foram identificados, examinados clinicamente por pelo menos dois veterinários e foi realizada a coleta de sangue para sorologia. Os cães que tiveram resultado positivo no exame sorológico e os que não foram reclamados por proprietários foram mantidos no canil municipal por 48 horas, com livre acesso a ração e água. Os cães foram, então, sedados com acepromazina (0,1 mg/kg IV, Acepram 1%, Vetnil Brasil) e tiopental sódico (15 mg/kg IV, Thiopentax 1g Cristália, Brasil) e a eutanásia foi realizada usando uma solução supersaturada de cloreto de potássio (2 ml/kg). Foi realizada punção esplênica para obtenção de material para cultura de *Leishmania*. Os cães foram submetidos à necropsia para coleta de amostras de baço e fígado para exame histológico e quantificação de carga parasitária por PCR em tempo real (RT-PCR).

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da FIOCRUZ para manipulação e experimentação com animais ([http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes\\_camaras-tecnicas/Manual\\_procedimentos.pdf](http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes_camaras-tecnicas/Manual_procedimentos.pdf)) e a lei sobre experimentação animal LEI Nº 11.794, DE 8 DE outubro DE 2008, ([http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm)). O estudo tem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do CPqGM-FIOCRUZ (CEUA, parecer nº 015/2009). Os detalhes técnicos do ELISA anti-*Leishmania* e da cultura de aspirado esplênico para identificação de *Leishmania* foram descritos

anteriormente por Dos Santos e colaboradores (2008). A carga parasitária no baço foi determinada por real RT-PCR, como descrito por Lima e colaboradores (2014).

Embora a maior parte dos animais tivesse evidência de infecção por *Leishmania*, alguns dos testes diagnósticos utilizados neste estudo, tais como PCR, podem não refletir a susceptibilidade destes animais para leishmaniose visceral. A sorologia positiva e cultura de aspirado esplênico positiva são ambos indicativos de uma infecção ativa (DOS-SANTOS, 2008; PARANHOS-SILVA, 2003). Por isso, levamos em consideração a positividade no ELISA e a cultura de aspirado esplênico, sendo os animais classificados em cães com infecção inativa, quando ambos os testes foram negativos, e com infecção ativa, quando um teste ou ambos foram positivos.

### **5.1.2 Exame clínico**

Os cães foram submetidos a exame clínico por dois veterinários, seguindo um formulário padrão. Nesse exame foram avaliados parâmetros como idade, sexo, porte, e os seguintes sinais clínicos:

- Emagrecimento: magros, animais com costelas e pelve evidente; caquéticos, animais com costelas e pelve aparentes e atrofia muscular na região temporal e escapular.
- Anemia: membranas mucosas pálidas (rosa claro) nos olhos e boca.
- Alopecia: regiões sem pelos em diferentes áreas da pele.
- Conjuntivite: inflamação da conjuntiva representada por vermelhidão ou secreção purulenta.
- Onicogribose: aumento (> 1 cm) das unhas em todos os membros.
- Linfadenopatia: aumento do tamanho dos linfonodos, considerando: em cães com peso inferior a 5 kg, linfonodos maiores do que 2 cm (eixo maior); cães com 5-10 kg e com linfonodo maior do que 3,5 cm, e cães com mais de 10 kg e com linfonodo maior que 4 cm.
- Esplenomegalia: animais com baço palpável além da última costela.
- Apatia: animal fraco, parado, sem ação quando contido, deitado.
- Úlcera: lesões da pele com perda da camada epitelial, com a superfície granular e bordas levantadas.
- Desidratação: redução do turgor cutâneo, visualizado através da redução da elasticidade da pele.

- Erosão: perda de toda ou parte da espessura da epiderme.

Os animais foram classificados quanto ao estado clínico levando em consideração os seguintes sinais clínicos: emagrecimento, anemia, linfadenopatia, esplenomegalia, alopecia, dermatite e onicogrifose. Os animais foram agrupados nas seguintes categorias de acordo com os sinais clínicos relatados sugestivos de leishmaniose visceral: assintomáticos (sem sinais clínicos) e sintomáticos (com qualquer dos sinais clínicos descritos acima).

Além do exame físico para a avaliação da presença de sinais clínicos, foi realizada a coleta de sangue dos animais avaliados em Jequié em 2010 e em Camaçari em 2012 para a realização de avaliação hematológica e da bioquímica sérica. Estas análises foram realizadas por laboratórios especializados em análises clínicas de animais domésticos.

### **5.1.3 Evidências de infecção por *Leishmania***

#### **5.1.3.1 ELISA**

Placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços (Cliniplate-Labsystem) foram revestidas com 100 µl de antígeno de *L. chagasi* (15 mg/ml) em tampão carbonato (0,06 M, pH 9,6). A concentração ótima de cada antígeno para a sensibilização da placa foi determinada em ensaios preliminares usando soro de animais infectados experimentalmente com as diferentes espécies de *Leishmania*. Reações não específicas foram bloqueadas com uma solução de PBS contendo 10% (w/v) de leite desnatado em pó. Após lavagem com PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-Tween), as amostras de soro, diluído a 1:400 e 1:1000 em tampão de ELISA [PBS contendo 10% (w/v) de leite desnatado em pó e 0,05% (v/v) de Tween-20] foram adicionados a cada poço. Conjugado de anti-IgG canino e peroxidase (Bethyl Laboratories) foi utilizado a uma diluição de 1:1000. Soros de controle positivos e negativos foram incluídos em cada ensaio. Valores acima da média dos resultados obtidos com soros de cães saudáveis (de uma área não endêmica) mais três desvios-padrão foram considerados positivos. Todos os soros foram testados em duplicatas e

os que produziram resultados positivos foram re-testados pelo menos uma vez (PARANHOS-SILVA, 2003). Parte dos animais passou por novos testes, pois foram incluídos em estudos do nosso laboratório. Ao todo, estes animais foram submetidos a 6 testes ELISA, nos quais 3 animais obtiveram resultado positivo em 3 testes e resultado negativo em 3 testes. Em razão disso, estes animais foram classificados como de resultado incerto ou em zona cinzenta (Grey Zone).

#### 5.1.3.2 *Cultura*

A cultura foi realizada por um período de 4 semanas. O aspirado esplênico foi mantido em meio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) bifásico a 23°C, suplementado com SFB a 20% (soro fetal de bovino - Gibco BRL, Nova Iorque, EUA) e 100µg de gentamicina para evitar a contaminação (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Para a identificação do parasita, as observações microscópicas foram realizadas em intervalos semanais pelo menos por 4 semanas (BARROUIN-MELO, 2004). Cada cultura esplênica foi preparada separada e individualmente, com identificação e duplo controle. Não foram realizados repiques das culturas.

#### 5.1.3.3 *PCR quantitativo (Real time PCR)*

Os fragmentos de baço foram obtidos durante a necropsia. As amostras foram coletadas utilizando agulhas ou lâminas de bisturi estéreis, e foram armazenados em criotubos livres de DNAase e RNAase, em nitrogênio líquido, até a extração do DNA. O DNA de cada amostra foi extraído utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Um total de 10mg de baço foi tratado segundo o protocolo da Qiagen para tecido animal. Uma vez extraído, a qualidade e a concentração de cada amostra de DNA foram determinadas utilizando um espectrofotômetro digital (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, EUA). As amostras de DNA foram então ajustadas a uma concentração de 30 ng/µl, aliquotadas e armazenadas a -20°C até a realização do PCR.

O PCR quantitativo foi utilizado para determinar os valores de DNA parasitário em amostras de baço de cães. A quantificação do DNA de *Leishmania* foi realizada utilizando um método absoluto com base na comparação dos valores de ciclo limiar (CT) com os valores de uma curva padrão construída a partir de 10 diluições em série de DNA de *L. infantum*, extraído a partir de culturas de parasitas (estirpe MHOM/BR/2000/MER2), variando de  $10^5$  a  $10^{-1}$  parasitas, com cada diluição feita em triplicata em cada placa. A amplificação do gene housekeeping canino (18S rRNA) foi utilizada com a intenção de normalizar a concentração de DNA de cada amostra, bem como para assegurar que os resultados negativos não estariam relacionados com problemas de amostragem, como a degradação do DNA, baixas quantidade de DNA, e a presença de inibidores do PCR na amostra. Para amplificar o gene de rRNA 18S como uma referência interna de DNA genômico canino, reagentes TaqMan assay (Perkin-Elmer Applied Biosystems) foram utilizados. Os primers têm como alvo RNA 18S de mamíferos, e não amplificam DNA genômico de *Leishmania*. Os ensaios de PCR foram realizados utilizando um processo de amplificação previamente descrito por Francino e colaboradores, 2006.

#### **5.1.4 Exame histológico**

As amostras de baço e fígado foram fixadas em formol a 10%, desidratadas em álcool, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. As secções histológicas foram cortadas com a espessura de 4,0  $\mu\text{m}$  e coradas pela hematoxilina-eosina (H&E), para análise em microscopia óptica convencional. Para o exame histológico do fígado, levamos em consideração as seguintes alterações: presença de inflamação portal, inflamação perivenular central (zonas 3 dos ácinos de Rappaport), hipertrofia de células de Kupffer, hiperplasia de células de Kupffer, linfocitose intrasinusoidal, agregados de células inflamatórias nos sinusóides, congestão e dilatação de sinusóides, granulomas em espaço porta, granulomas intrasinusoidais, esteatose hepatocelular, balonização dos hepatócitos, necrose e apoptose hepatocelulares. As alterações foram avaliadas com relação à presença e intensidade, sendo classificadas como discreta (1), moderada (2) e intensa (3). Foi calculado um escore histológico de

cada animal, somando-se todas as alterações, levando em consideração a intensidade de cada uma.

Como parâmetros de análise para a classificação da organização da polpa branca esplênica utilizamos os critérios previamente descritos por Santana e colaboradores (2008). Resumidamente: (a) bem organizado, com bainha periarteriolar de linfócitos distinta, centro germinativo, zona do manto e zona marginal, (b) levemente desorganizado, com alterações hiperplásicas ou hipoplásicas levando a uma perda de definição dos limites entre as regiões da polpa branca, (c) moderadamente a extensivamente desorganizado, quando a polpa branca era evidente, mas as suas regiões eram pobremente individualizadas ou indistintas, ou quando a estrutura folicular mal era distinta da polpa vermelha e das áreas de células T.

#### **5.1.5 Imunoistoquímica anti *Leishmania***

O procedimento de imunoistoquímica foi realizado em colaboração com o Dr Professor Wagner Luiz Tafuri, do Departamento de Patologia Geral, Laboratório de Patologia das Leishmanioses, UFMG. As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas com peróxido de hidrogênio (30vv) a 4% em tampão fosfato (PBS, pH 7.2; 0,1M) para bloqueio da peroxidase endógena, seguindo de incubação com solução de bloqueio (12g de leite em pó desnatado diluído em 200mL de PBS). Soro de cão naturalmente infectado com *L. chagasi* foi diluído a 1:100 em PBS-BSA (0,01%) e foi utilizado como anticorpo primário. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 4°C por 18-22h. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (anti-soro de coelho biotilado anti-camundongo IgG1) (Dako®, Carpinteria, CA, 192 USA; LSAB2 kit) por 20 minutos a temperatura ambiente, lavadas em PBS, e incubadas com o complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako®; LSAB2 kit) por 20 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram tratadas com diaminobenzidina 0,024% (Sigma®) e 0,16% peróxido de hidrogênio (30vv), desidratadas, clarificadas e contra coradas com hematoxilina de Harris e montadas com meio de montagem rápida entellan (Entellan®, 107960 - Merck KGA, Darmstadt, Alemanha). Para cada bateria de 20 lâminas, utilizou-se um controle

positivo. Com o intuito de identificar as formas amastigotas de *Leishmania*, todos os campos foram avaliados (TAFURI, 2004).

#### **5.1.6 Análise e expressão dos resultados**

Os dados foram analisados utilizando os programas STATA Statistics/Data Analysis 11.0, GraphPad Prism 5.02 e Excel. Os resultados são expressos em valores absolutos ou relativos, em tabelas associadas a gráficos. A significância das diferenças entre os grupos foi testada usando o teste de Kruskal-Wallis. Para diferenças significativas, a diferença entre dois grupos foi identificada por meio do teste de comparação múltipla de Dunn. Para as comparações envolvendo proporções, foi utilizado o teste de probabilidade exato de Fisher. O valor crítico para significância dos resultados foi estabelecido para  $p < 0,05$ .

## 5.2 RESULTADOS

### 5.2.1 Características gerais da amostra:

As principais características dos 148 animais incluídos neste trabalho estão apresentadas na Tabela 1. Foi observada positividade no ELISA em 118 (80%) dos animais, na cultura de aspirado esplênico 67 (45%) dos animais foram positivos, e no PCR, 127 de 135 dos animais (94%) foram positivos. Sinais clínicos associados a leishmaniose visceral canina estavam presentes em 133 (90%) animais. Entre os 148 cães, um foi excluído da análise da estrutura da polpa branca esplênica por não ter amostra para análise, sendo 147 animais analisados, dos quais 39 (27%) tiveram baço tipo 1 (com polpa branca do baço organizada); 74 (50%) tiveram baço tipo 2 (com polpa branca ligeiramente desorganizada); e 34 (23%) tiveram baço tipo 3 (com polpa branca moderada a intensamente desorganizada, Tabela 1).

Dos 52 cães que obtiveram resultado positivo em todos os testes, 3 (6%) eram assintomáticos e 49 (94%) eram sintomáticos. Em relação à organização da polpa branca esplênica, dos 51 cães com resultado positivo em todos os testes, 14 (27%) possuíam baço do tipo 1, 27 (53%) possuíam baço do tipo 2, e 10 (20%) possuíam baço do tipo 3.

Tabela 1. Características gerais da amostra

	Frequência	(%)
<b>N</b>	148	(100)
<b>Gênero</b>		
Macho	84	(57)
Fêmea	64	(43)
<b>Idade</b>		
0 a 2 Anos	16/106	(15)
3 a 5 anos	73/106	(69)
Mais de 6 anos	17/106	(16)
<b>Porte</b>		
Pequeno	36/146	(25)
Médio	85/146	(58)
Grande	25/146	(17)
<b>Baço</b>		
Tipo 1	39/147	(27)
Tipo 2	74/147	(50)
Tipo 3	34/147	(23)
<b>Classificação clínica</b>		
Assintomático	15	(10)
Sintomático	133	(90)
<b>ELISA</b>		
Negativo	27	(18)
Positivo	118	(80)
Grey Zone	3	(2)
<b>Cultura</b>		
Negativo	81	(55)
Positivo	67	(45)
<b>PCR</b>		
Negativo	8/135	(6)
Positivo	127/135	(94)
<b>Positivos em todos os testes</b>	52	(35)

### 5.2.2 Alterações histológicas no fígado em relação à presença de infecção ativa:

As principais alterações histológicas observadas nos animais estão apresentadas na figura 1. As alterações mais frequentes foram inflamação nos espaços porta (96%) e em torno de veias centrais (96%), ambas compostas por infiltrado predominantemente linfoplasmocitário. Foram observados granulomas nos sinusóides em 62% dos casos (n=79), compostos por células macrofágicas, por vezes parasitadas, linfócitos e, em alguns casos, plasmócitos, com grande variação no tamanho e no grau de organização, havendo desde agrupamentos desorganizados de células epitelióides até granulomas circunscritos e bem organizados, contendo

células epitelióides e mais de 10 células mononucleares em torno das células de Kupffer parasitadas. As células de Kupffer estavam hiperplasiadas em 66% dos casos e hipertrofiadas em 62% dos casos. Infiltrado inflamatório de células mononucleares linfocitárias dentro dos sinusóides foi observado em 78% dos animais com formação de pequenos agregados de células inflamatórias em 61%.

Houve diferença estatisticamente significativa entre animais com infecção ativa e inativa em relação à frequência de inflamação portal ( $p=0,0199$ ) e à presença de agregados de células inflamatórias nos sinusóides ( $p=0,0496$ ), que foram maiores nos animais com infecção ativa do que nos animais com infecção inativa (teste exato de Fisher, figura 1). Não houve diferenças estatisticamente significantes quanto as demais alterações analisadas.

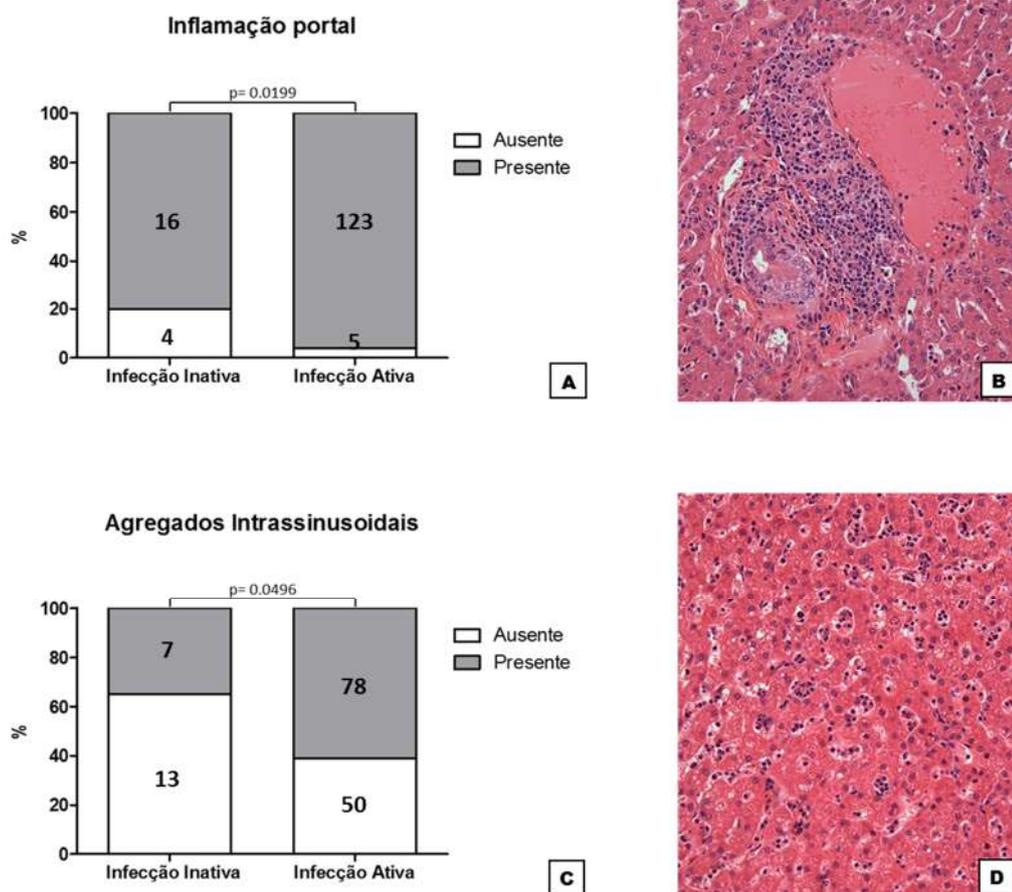


Figura 1. Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*. A: frequência de inflamação portal em animais com e sem infecção ativa; B: inflamação portal (20x); C: frequência de agregados de células inflamatórias em animais com e sem infecção ativa; D: agregados intrassinusoidais de células inflamatórias (20x).

Com relação ao escore histológico, foi observado que os animais com infecção ativa apresentam maior escore de alterações histológicas quando comparados com os animais com infecção inativa ( $p= 0.0363$ , teste Mann-Whitney, figura 2).

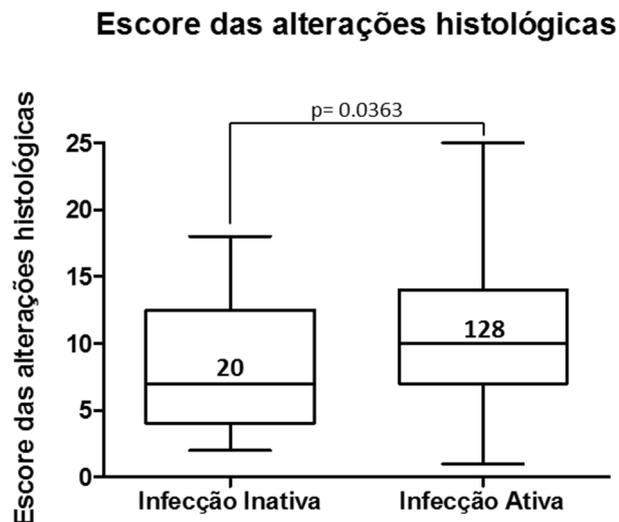


Figura 2. Escore de alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*.

### 5.2.3 Associação entre alterações histológicas e manifestações clínicas:

A associação observada entre as alterações histológicas do fígado e as manifestações clínicas estão descritas na figura 3. Houve diferenças entre todos os grupos no que se refere a inflamação portal ( $p= 0.0010$ ), hipertrofia de células de Kupffer ( $p= 0.0374$ ), linfocitose intrasinusoidal ( $p= 0.0180$ ), agregados intrassinusoidais ( $p= 0.0002$ , teste Chi-square for trend, figura 3).

Animais com infecção inativa e assintomáticos diferem de animais com infecção ativa sintomáticos em relação à presença de inflamação portal ( $p=0.0187$ ) e agregados intrassinusoidais ( $p=0.0063$ ). O grupo de animais com infecção ativa

assintomáticos difere do grupo com infecção ativa sintomáticos no que se refere à frequência de hipertrofia de células de Kupffer ( $p= 0.0398$ ), linfocitose intrassinusoidal ( $p= 0.0074$ ) e agregados intrassinusoidais ( $p=0.0009$ , teste exato de Fisher, figura 3), sendo estas alterações mais frequentes nos animais com infecção ativa e sintomáticos.

Não houve diferenças entre os grupos em relação a hiperplasia de células de Kupffer, granulomas portais, congestão e dilatação de sinusóides, esteatose, balonização e necrose de hepatócitos.

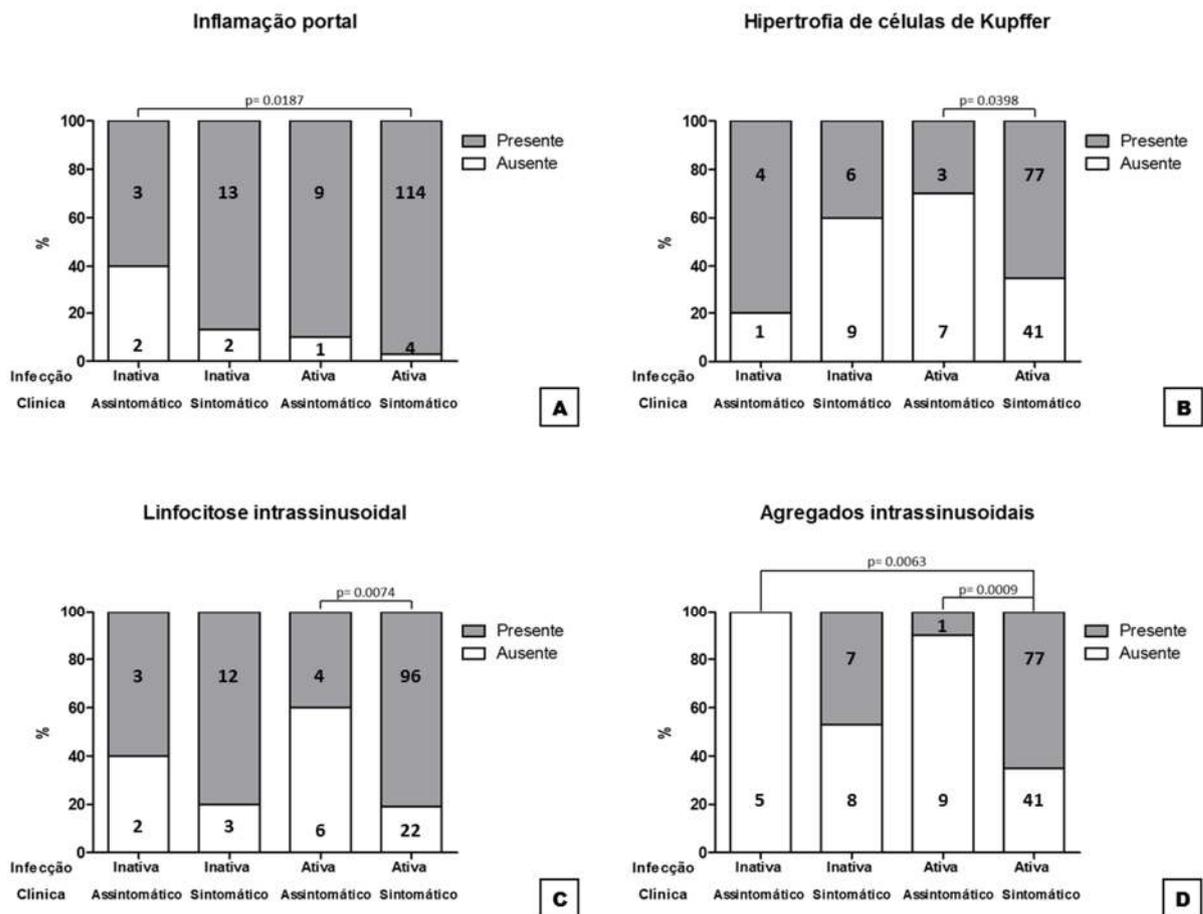


Figura 3. Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com diferentes manifestações clínicas. A: inflamação portal; B: hipertrofia de células de Kupffer; C: linfocitose intrassinusoidal; D: agregados intrassinusoidais.

Como mostrado na tabela 2, a chance de desenvolver inflamação portal (OR=5,7, IC=1,43,3-22,8), hipertrofia de células de Kupffer (OR = 4,4, CI = 1,2-16,3), linfocitose intrassinusoidal (OR = 6,9, CI = 1,3-37,2) e agregados intrassinusoidais (OR = 9,7, IC = 2,8-32,8) foi maior em animais com infecção ativa e sintomáticos do que nos demais grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa com relação às demais alterações.

Tabela 2. Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com relação às manifestações clínicas.

	<b>Infecção ativa e Sintomático</b>	<b>Demais grupos</b>	<b>OR</b>		<b>OR (ajuste por carga parasitária no baço)</b>	
<b>N (%)</b>			<i>OR</i>	[95% I.C.]	<i>OR</i>	[95% I.C.]
<b>Inflamação portal</b>	114 (97)	25 (83)	5,70 <sup>a</sup>	[1,4 - 22,8]	5,33 <sup>a</sup>	[1,2 - 24,0]
<b>Granuloma Intrassinusoidal</b>	73 (62)	14 (47)	1,85	[0,8 - 4,2]	2,12	[0,9 - 5,0]
<b>Hiperplasia de células de Kupffer</b>	82 (69)	16 (53)	1,99	[0,9 - 4,5]	2,35	[1,0 - 5,62]
<b>Hipertrofia de células de Kupffer</b>	77 (65)	13 (43)	2,45 <sup>a</sup>	[1,1 - 5,6]	2,78 <sup>a</sup>	[1,2 - 6,6]
<b>Granuloma portal</b>	27 (23)	3 (10)	2,67	[0,8 - 9,5]	2,17	[0,6 - 8,1]
<b>Linfocitose intrassinusoidal</b>	96 (81)	19 (63)	2,53 <sup>a</sup>	[1,0 - 6,1]	2,69 <sup>a</sup>	[1,1 - 6,8]
<b>Congestão de sinusóides</b>	16 (14)	5 (17)	0,78	[0,3 - 2,3]	0,81	[0,3 - 2,5]
<b>Dilatação de sinusóides</b>	22 (19)	5 (17)	1,15	[0,4 - 3,3]	1,06	[0,4 - 3,2]
<b>Agregados intrassinusoidais</b>	77 (65)	8 (27)	5,16 <sup>b</sup>	[2,1 - 12,6]	5,69 <sup>b</sup>	[2,2 - 14,5]
<b>Inflamação perivascular</b>	113 (96)	27 (90)	2,51	[0,6 - 11,2]	2,18	[0,5 - 10,4]
<b>Esteatose de hepatócitos</b>	23 (20)	5 (17)	1,21	[0,4 - 3,5]	1,15	[0,4 - 3,5]
<b>Balonização de hepatócitos</b>	26 (22)	5 (17)	1,41	[0,5 - 4,0]	0,78	[0,25 - 2,5]
<b>Necrose de hepatócitos</b>	19 (16)	6 (20)	0,77	[0,3 - 2,1]	0,83	[0,3 - 2,4]

<sup>a</sup> P < 0.05; <sup>b</sup> P < 0.01

Com relação ao escore histológico, foi observado que os animais com infecção ativa e sintomáticos apresentam maior escore de alterações histológicas quando comparados com os animais com infecção inativa e assintomáticos ( $p= 0.0384$ , teste Mann-Whitney, figura 4).

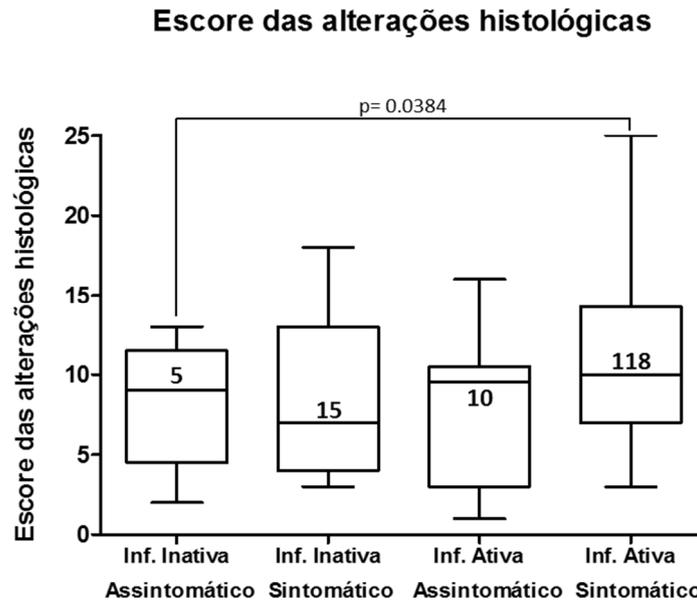


Figura 4. Escore de alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com diferentes manifestações clínicas.

#### **5.2.4 Associação entre alterações histológicas no fígado e alterações laboratoriais:**

A associação entre as alterações histológicas observadas no fígado dos animais estudados e alterações em hemograma e exames bioquímicos está mostrada nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

Foi observada uma associação entre a redução nos valores de hemácias, dosagem de hemoglobina e hematócrito nos animais com inflamação portal e inflamação perivascular central intensas, quando comparados com animais com tais alterações em discreta intensidade e sem as alterações. Um quadro semelhante foi observado em relação aos valores de plaquetas e linfocitose intrassinusoidal (teste Mann Whitney, tabela 3).

Foi observada uma associação entre aumento nos níveis séricos de TGO e inflamação portal intensa, granulomas intrassinusoidais e granulomas portais em maior frequência. Situação semelhante é vista em relação aos níveis séricos de TGP e granulomas portais frequentes (teste Mann Whitney, tabela 4).

Inflamação perivascular intensa está associada à menores valores de albumina sérica. Em relação aos agregados intrassinusoidais, são observados maiores valores de globulina, e uma menor relação albumina/globulina, nos animais com maior frequência de agregados (teste Mann Whitney, tabela 5).

Foi observada também uma associação entre o aumento nos valores séricos de triglicérides e uma maior frequência de granulomas intrassinusoidais, bem como entre o aumento nos níveis séricos de colesterol e uma maior intensidade de inflamação perivascular (teste Mann Whitney, tabela 6).

Tabela 3: Associação entre alterações histológicas em fígado e alterações hematológicas.

Alteração histológica	Hemácias		Hemoglobina		Hematócrito		Plaquetas (x10 <sup>3</sup> )		Leucócitos (x10 <sup>3</sup> )	
	Mediana	[p25-p75, N]	Mediana	[p25-p75, N]	Mediana	[p25-p75, N]	Mediana	[p25-p75, N]	Mediana	[p25-p75, N]
<b>Inflamação portal</b>										
Ausente	5.78	[5.72 - 5.84, 2]	12.5	[12.3 - 12.7, 2]	37.4	[37.1 - 37.7, 2]	151	[6.0 - 296.0, 2]	11.4	[11.2-11.6, 2]
Discreta	5.07 <sup>b</sup>	[4.23 - 5.95, 39]	10.6 <sup>b</sup>	[9.0 - 12.8, 39]	31.7 <sup>b</sup>	[27.0 - 37.9, 39]	104	[31.0 - 232.0, 39]	14.1	[10.3-17.5, 39]
Moderada	4.13 <sup>c</sup>	[3.88 - 5.26, 15]	9.7 <sup>c</sup>	[8.7 - 11.5, 15]	30 <sup>c</sup>	[24.5 - 35.5, 15]	90	[29.0 - 154.0, 15]	13.7	[9.0-18.5, 15]
Intensa	2.73	[2.7 - 3.2, 3]	6.6	[4.8 - 7.5, 3]	18.2	[15.0 - 21.0, 3]	125	[33.0 - 155.0, 3]	13.2	[7.5-16.2, 3]
<b>Inflamação perivascular</b>										
Ausente	5.72	[3.9-5.84, 3]	12.3	[8.8-12.7, 3]	37.1	[25.0-37.7, 3]	211	[6.0-296.0, 3]	11.6	[11.2-15.8, 3]
Discreta	5.07 <sup>b</sup>	[4.28-5.94, 33]	10.6 <sup>b</sup>	[9.0-12.8, 33]	32.0 <sup>b</sup>	[27.65-38.4, 33]	140	[62.0-247.0, 33]	13.9	[10.2-17.4, 33]
Moderada	4.68 <sup>c</sup>	[3.96-5.66, 19]	10.3 <sup>c</sup>	[9.0-11.8, 19]	30.4 <sup>c</sup>	[25.8-36.7, 19]	104	[53.0-165.0, 19]	13.7	[9.0-18.5, 19]
Intensa	2.90	[2.7-3.68, 4]	6.85	[5.25-8.3, 4]	18.9	[15.8-23.28, 4]	77	[19.25-147.5, 4]	14.7	[9.52-32.25, 4]
<b>Linfocitose intrassinusoidal</b>										
Ausente	3.47	[1.64-5.3, 2]	8.25	[4.0-12.5, 2]	23.7	[12.4-35.0, 2]	137 <sup>a</sup>	[25.0-249.0, 2]	9.8	[7.2-12.4, 2]
Discreta	4.69	[4.08-5.8, 19]	10.5	[7.8-12.3, 19]	31.4	[25.0-37.7, 19]	202	[93.0-296.0, 19]	14.1	[10.4-18.6, 19]
Moderada	4.90	[3.95-5.94, 26]	10.5	[9.0-12.18, 26]	30.8	[27.0-36.75, 26]	120	[83.0-175.25, 26]	13.5	[10.5-16.4, 26]
Intensa	4.83	[3.9-5.67, 12]	10.7	[8.72-13.63, 12]	33.4	[24.68-39.6, 12]	63	[40.5-148.75, 12]	14.9	[8.1-18.1, 12]

a: diferença entre animais sem alteração e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney); b: diferença entre animais com alteração discreta e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney); c: diferença entre animais com alteração moderada e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney).

Tabela 4: Associação entre alterações histológicas em fígado e alterações bioquímicas.

Alteração histológica	TGO		TGP	
	Mediana	[p25-p75, N]	Mediana	[p25-p75, N]
<b>Inflamação portal</b>				
Ausente	30	[26.0-34.0, 2]	32.5	[32.0-33.0, 2]
Discreta	33.5 <sup>b</sup>	[24.25-51.75, 44]	37	[27.0-43.0, 40]
Moderada	45 <sup>c</sup>	[28.0-54.0, 17]	40	[29.0-65,5, 17]
Intensa	83	[70.0-112.5, 4]	50	[22.0-72.75, 4]
<b>Granulomas intrassinusoidais</b>				
Ausente	35 <sup>a</sup>	[28.5-49.5, 25]	34	[26.0-42.5, 25]
Discreto	38 <sup>b</sup>	[24.0-61.5, 21]	35	[27.0-43.0, 21]
Moderado	31.5 <sup>c</sup>	[25.0-48.75, 10]	38.5	[29.25-44.75, 10]
Intenso	75	[49.0-110.0, 7]	72	[36.0-82.0, 7]
<b>Granulomas portais</b>				
Ausente	34 <sup>a</sup>	[25.0-48.0, 55]	36 <sup>a</sup>	[27.0-43.0, 55]
Discreto	68 <sup>b</sup>	[51.75-97.0, 4]	40.5	[30.5-47.5, 4]
Moderado	68	[68.0-68.0, 1]	20	[20.0-20.0, 1]
Intenso	90	[75.0-120.0, 3]	73	[72.0-120.0, 3]

a: diferença entre animais sem alteração e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney); b: diferença entre animais com alteração discreta e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney); c: diferença entre animais com alteração moderada e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney).

Tabela 5: Associação entre alterações histológicas em fígado e alterações bioquímicas.

Alteração histológica	Albumina		Globulina		Razão A/G	
	Mediana	[p25-p75, N]	Mediana	[p25-p75, N]	Mediana	[p25-p75, N]
<b>Inflamação perivasculare</b>						
Ausente	3.3 <sup>a</sup>	[2.7-3.5, 3]	5.3	[5.1-6.7, 3]	0.62	[0.4-0.69, 3]
Discreta	2.85 <sup>b</sup>	[2.4-3.3, 34]	7.3	[6.2-8.95, 34]	0.36	[0.30-0.52, 34]
Moderada	2.7 <sup>c</sup>	[2.4-3.35, 21]	7.8	[6.9-9.0, 21]	0.33	[0.28-0.48, 21]
Intensa	1.8	[1.72-2.18, 4]	6.5	[5.62-7.9, 4]	0.28	[0.22-0.4, 4]
<b>Agregados intrassinusoidais</b>						
Ausente	2.7	[2.4-3.3, 17]	6.7 <sup>a</sup>	[5.3-7.85, 17]	0.43 <sup>a</sup>	[0.33-0.56, 17]
Discreto	3	[2.25-3.5, 21]	6.7 <sup>b</sup>	[5.6-7.6, 21]	0.42 <sup>b</sup>	[0.31-0.62, 21]
Moderado	2.65	[2.4-3.22, 18]	8.5	[7.45-9.65, 18]	0.295	[0.277-0.377, 18]
Intenso	2.4	[2.07-2.95, 6]	8.2	[6.82-10.18, 6]	0.265	[0.23-0.422, 6]

a: diferença entre animais sem alteração e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney); b: diferença entre animais com alteração discreta e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney); c: diferença entre animais com alteração moderada e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney).

Tabela 6: Associação entre alterações histológicas em fígado e alterações bioquímicas.

Alteração histológica	Triglicerídeos		Colesterol	
	Mediana	[p25-p75, N]	Mediana	[p25-p75, N]
<b>Granulomas intrassinusoidais</b>				
Ausente	44.5 <sup>a</sup>	[32.5-66.25, 22]	169.0	[153.0-219.5, 22]
Discreto	47.5 <sup>b</sup>	[31.75-59.5, 18]	167.0	[134.8-202.0, 18]
Moderado	55.0	[41.0-69.5, 9]	175.0	[139.0-222., 9]
Intenso	83.0	[72.0-102.0, 5]	236.0	[130.5-360.5, 5]
<b>Inflamação perivascular</b>				
Ausente	28.0	[25.0-31.0, 2]	159.5	[157.0-162.0, 2]
Discreto	46.0	[31.0-64.0, 31]	165.0 <sup>b</sup>	[130.0-233.0, 31]
Moderado	57.5	[44.25-81.25, 18]	177.5 <sup>c</sup>	[157.8-215.8, 18]
Intenso	82.0	[41.0-83.0, 3]	332.0	[269.0-448.0, 3]

a: diferença entre animais sem alteração e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney); b: diferença entre animais com alteração discreta e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney); c: diferença entre animais com alteração moderada e animais com alteração intensa (teste Mann Whitney).

### 5.2.5 Associação entre alterações histológicas e organização da polpa branca esplênica:

A associação entre as alterações histológicas observadas no fígado dos animais estudados e a organização da polpa branca esplênica está representada na figura 5. Houve diferenças entre todos os grupos no que se refere a inflamação portal ( $p= 0.0007$ , teste Chi-square for trend, figura 5).

Animais com infecção inativa e com baço tipo 2 diferem de animais com infecção ativa com baço tipo 2 em relação à presença de inflamação portal ( $p=0.0213$ ) e presença de granulomas intrassinusoidais, sendo estas alterações mais frequentes nos animais com infecção ativa e baço do tipo 2 ( $p= 0.0418$ , teste exato de Fisher, figura 5).

Não houve diferenças entre os grupos em relação à presença de hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer, granulomas portais, linfocitose intrassinusoidal, congestão e dilatação de sinusóides, agregados intrassinusoidais, inflamação perivascular, esteatose, balonização e necrose de hepatócitos.

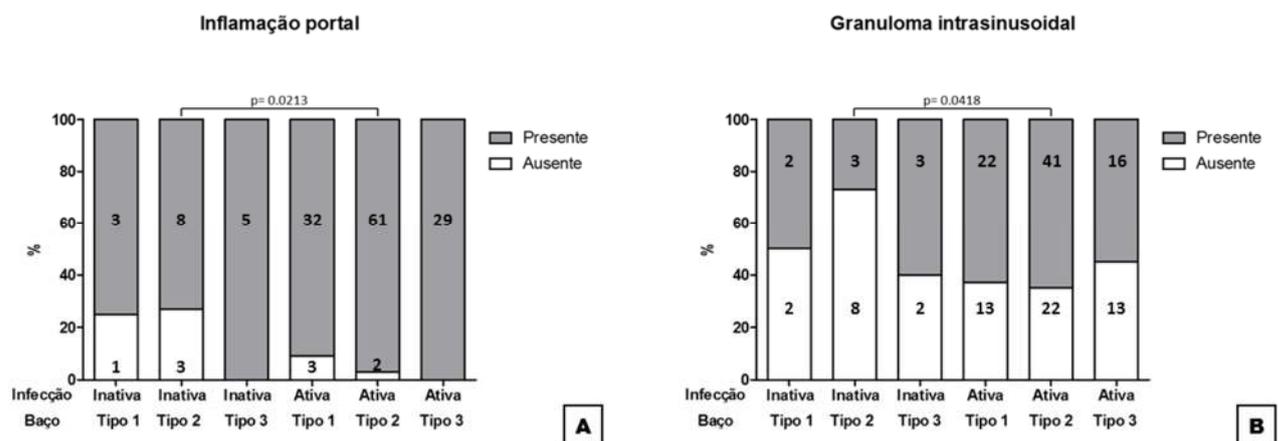


Figura 5. Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com diferentes graus de organização da polpa branca esplênica. A: inflamação portal; B: granuloma intrasinusoidal.

Como mostrado na tabela 7, a chance de desenvolver hipertrofia de células de Kupffer (OR = 3,05, CI = 1,1- 8,8) foi maior em animais com infecção ativa e baço do tipo 3 do que nos demais grupos.

Tabela 7. Alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com relação à organização da polpa branca esplênica.

	<b>Infecção ativa e Baço tipo 3</b>	<b>Demais grupos</b>	<b>OR</b>		<b>OR (ajuste por carga parasitária no baço)</b>	
<b>N (%)</b>			<i>OR</i>	[95% I.C.]	<i>OR</i>	[95% I.C.]
<b>Inflamação portal</b>	29 (100)	118 (100)				
<b>Granuloma Intrassinusoidal</b>	16 (55)	71 (60)	0,83	[0,4 – 1,9]	1,13	[0,4 – 2,8]
<b>Hiperplasia de células de Kupffer</b>	23 (79)	75 (64)	2,25	[0,8 – 6,0]	2,29	[0,8 – 6,7]
<b>Hipertrofia de células de Kupffer</b>	22 (76)	68 (58)	2,36	[0,9 – 5,9]	3,05 <sup>a</sup>	[1,1 – 8,8]
<b>Granuloma portal</b>	6 (21)	24 (20)	1,03	[0,4 – 2,8]	1,12	[0,4 – 3,4]
<b>Linfocitose intrassinusoidal</b>	23 (79)	91 (77)	1,12	[0,4 – 3,0]	1,21	[0,4 – 3,6]
<b>Congestão de sinusóides</b>	8 (28)	13 (11)	3,11	[1,2 – 8,4]	4,15	[1,5 – 11,9]
<b>Dilatação de sinusóides</b>	8 (28)	19 (16)	2,00	[0,8 – 5,2]	3,04	[1,1 – 8,4]
<b>Agregados intrassinusoidais</b>	16 (55)	68 (58)	0,89	[0,4 – 2,2]	0,85	[0,4 – 2,1]
<b>Inflamação perivascular</b>	28 (96)	111 (94)	1,75	[0,2 – 14,8]	1,45	[0,2 – 12,7]
<b>Esteatose de hepatócitos</b>	8 (28)	20 (17)	1,88	[0,7 – 4,9]	1,93	[0,7 – 5,4]
<b>Balonização de hepatócitos</b>	8 (28)	23 (19)	1,59	[0,6 – 4,0]	1,33	[0,4 – 4,1]
<b>Necrose de hepatócitos</b>	9 (31)	16 (14)	2,9	[1,1 – 7,5]	2,39	[0,9 – 6,8]

<sup>a</sup> P < 0.05

Com relação ao escore histológico, foi observado que os animais com infecção ativa e baço do tipo 2 apresentam maior escore de alterações histológicas quando comparados com os animais com infecção ativa e baço do tipo 1 (p= 0.0367) e quando comparados com os animais com infecção inativa e baço do tipo 2 (p= 0.0420, teste Mann-Whitney, figura 6).

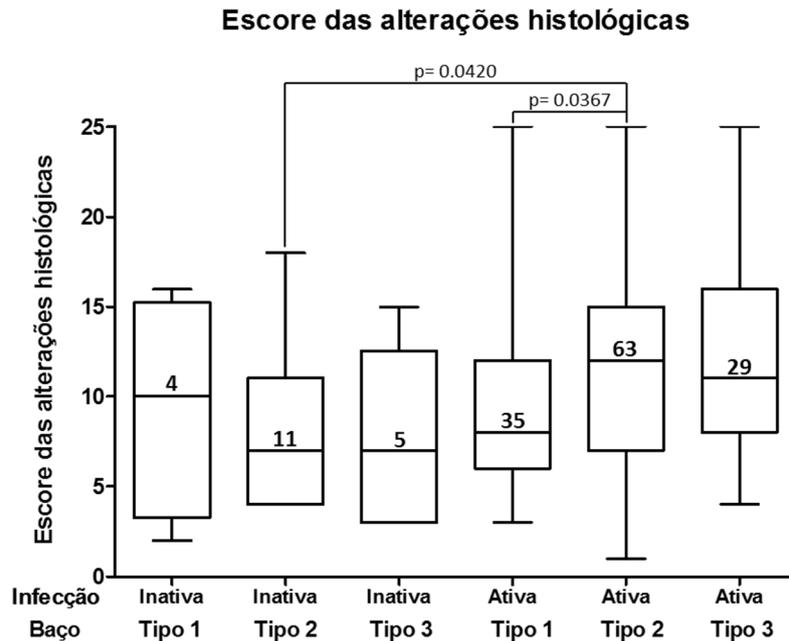


Figura 6. Escore de alterações histológicas no fígado de cães com e sem infecção ativa por *Leishmania*, com diferentes graus de organização da polpa branca esplênica.

### 5.2.6 Associação entre alterações histológicas no fígado e carga parasitária no baço:

A associação observada entre as alterações histológicas no fígado dos animais estudados e a carga parasitária no baço está demonstrada na figura 7. Foi observada uma maior carga parasitária esplênica nos grupos de animais com inflamação portal intensa, com inflamação perivenular central intensa, com granulomas intrassinusoidais e portais em maior frequência (teste Mann-Whitney, figura 7). Em relação à linfocitose intrassinusoidal, agregados intrassinusoidais de células inflamatórias e hipertrofia de células de Kupffer, a maior carga parasitária esplênica está associada à ausência de tais alterações (teste Mann-Whitney, figura 7).

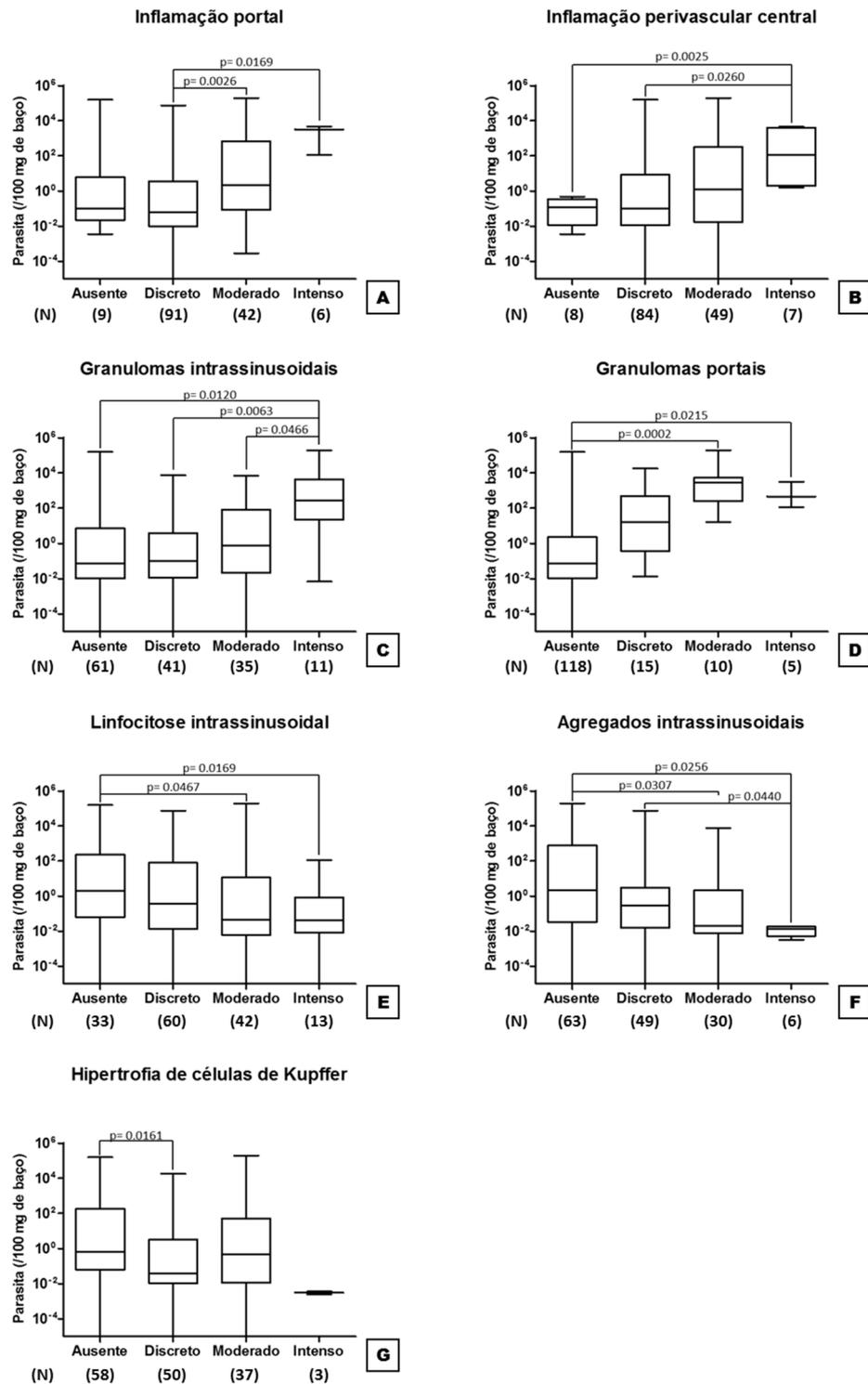


Figura 7: Associação entre alterações histológicas em fígado e parasitismo esplênico. A: associação entre inflamação portal e parasitismo esplênico; B: associação entre inflamação perivascular central e parasitismo esplênico; C: associação entre granulomas intrassinusoidais e parasitismo esplênico; D: associação entre granulomas portais e parasitismo esplênico; E: associação entre linfocitose intrassinusoidal e parasitismo esplênico; F: associação entre agregados intrassinusoidais de células inflamatórias e parasitismo esplênico; G: associação entre hipertrofia de células de Kupffer e parasitismo esplênico.

### 5.2.7 Avaliação de parasitismo no fígado:

Foi realizada reação imunoistoquímica para a verificação da presença de amastigotas de *Leishmania* em amostras de 20 animais, todos com infecção ativa e diferentes perfis clínicos. Das amostras testadas, 10 (50%) tiveram resultado negativo e 10 tiveram resultado positivo (50%), sendo 4 com parasitismo discreto (20%), 2 (10%) apresentaram parasitismo moderado, e 2 (10%) apresentaram parasitismo intenso (Figura 8). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais com e sem parasitas no fígado, em relação às alterações histológicas, como presença de inflamação portal, inflamação perivenular central, hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer, linfocitose intrasinusoidal, agregados de células inflamatórias nos sinusóides, congestão e dilatação de sinusóides, granulomas em espaço porta, granulomas intrassinusoidais, esteatose hepatocelular, balonização dos hepatócitos, necrose e apoptose hepatocelulares.

Dos 20 animais testados, quatro (20%) não apresentavam granulomas, e destes, apenas um (25%) tinha parasitos, em quantidade moderada. Dos animais que possuíam granulomas, seis apresentavam granulomas organizados (30%), sendo três (50%) negativos para a presença de parasitos, um (17%) apresentando parasitismo discreto, e 2 (33%) apresentando parasitismo intenso. Os 10 (50%) animais restantes apresentavam granulomas desorganizados, sendo 4 (40%) negativos para a presença de parasitos, 3 (30%) apresentando parasitismo discreto, 2 (20%) parasitismo moderado, e 1 (10%) parasitismo intenso. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais com granulomas organizados e desorganizados com relação à presença de parasitos no fígado (teste Chi-square).

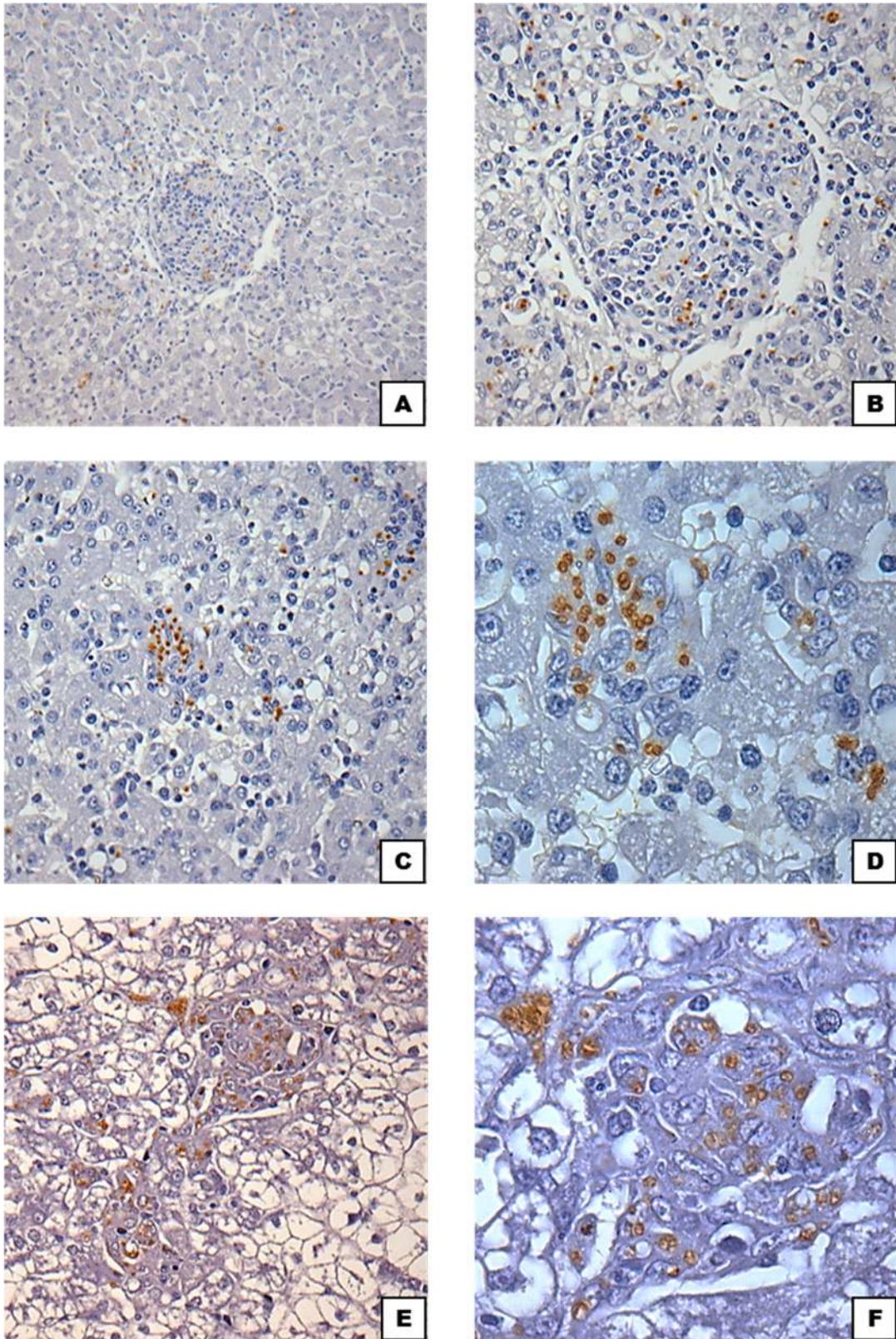


Figura 8: Avaliação da presença de parasitos no fígado. A: granuloma contendo amastigotas em seu interior e ao redor. Reação imunoistoquímica anti-*Leishmania* (20x); B: granuloma contendo amastigotas em seu interior e ao redor. Reação imunoistoquímica anti-*Leishmania* (40x); C: células contendo amastigotas em seu interior. Reação imunoistoquímica anti-*Leishmania* (40x); D: células contendo amastigotas em seu interior. Reação imunoistoquímica anti-*Leishmania* (100x); E: granuloma contendo amastigotas em seu interior e ao redor. Reação imunoistoquímica anti-*Leishmania* (40x); F: granuloma contendo amastigotas em seu interior e ao redor. Reação imunoistoquímica anti-*Leishmania* (100x).

## 6. ESTUDO DOS GRANULOMAS EM FÍGADO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE INFECTADOS

### 6.1 METODOLOGIA

#### 6.1.1 Animais

As amostras e dados clínicos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de 24 cães capturados em colaboração com o Centro de Controle de Zoonoses Camaçari, BA, durante seu inquérito sorológico de rotina, no ano de 2015. Os animais foram identificados, examinados clinicamente por pelo menos dois veterinários e foi realizada a coleta de sangue para sorologia. Os cães que tiveram resultado positivo no exame sorológico foram mantidos no canil municipal por 48 horas, com livre acesso a ração e água. Os cães foram, então, sedados com acepromazina (0,1 mg/kg IV, Acepram 1%, Vetnil Brasil) e tiopental sódico (15 mg/kg IV, Thiopentax 1g Cristália, Brasil) e sacrificados usando uma solução supersaturada de cloreto de potássio (2 mL/kg). Foi realizada punção esplênica para obtenção de material para cultura de *Leishmania*. Os cães foram submetidos à necropsia para coleta de amostras de baço e fígado para exame histológico e quantificação de carga parasitária por real time PCR.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da FIOCRUZ para manipulação e experimentação com animais ([http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes\\_camaras-tecnicas/Manual\\_procedimentos.pdf](http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes_camaras-tecnicas/Manual_procedimentos.pdf)) e a lei sobre experimentação animal LEI Nº 11.794, DE 8 DE outubro DE 2008, ([http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm)). O estudo tem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do CPqGM-FIOCRUZ (CEUA, parecer nº 015/2009). Os detalhes técnicos do ELISA anti-*Leishmania*, e da cultura de aspirado esplênico para identificação de *Leishmania* foram descritos anteriormente por Dos Santos e colaboradores (2008). A carga parasitária no baço foi determinada por real time PCR, como descrito por Lima e colaboradores (2014).

### 6.1.2 Exame clínico

Os animais foram submetidos a exame clínico e classificados de acordo com os parâmetros descritos por Solcá e colaboradores (2016, Quadro 1). Cada sinal clínico recebeu um grau de 0, 1 ou 2 dependendo da intensidade da manifestação clínica. O escore clínico foi calculado como a soma dos graus para cada sinal clínico com pesos iguais. A pontuação composta poderia então variar de 0 a 24 pontos. Os animais infectados e com um escore clínico de  $\leq 3$  foram classificados como sem doença clínica (subclínica); classificação clínica de  $\geq 4 < 7$  foi categorizada como doença leve e uma pontuação clínica de  $\geq 7$  foi utilizada para definir a doença grave.

Quadro 1: Parâmetros clínicos utilizados no cálculo do escore clínicos dos animais coletados em Camaçari no ano de 2015.

Sinais clínicos	Escore baseado em intensidade		
	0	1	2
Estado nutricional	Normal ou obeso	Magro	Caquético
Coloração de mucosas	Normal	Anêmicas	-
Dermatite periorcular	Ausente	Presente em um olho	Presente nos dois olhos
Crosta em orelha	Ausente	Presente em uma orelha	Presente nas duas orelhas
Úlcera em orelha	Ausente	Presente em uma orelha	Presente nas duas orelhas
Despigmentação em focinho	Ausente	Presente em menos de 1/3 do focinho	Presente em mais de 1/3 do focinho
Hiperqueratose em focinho	Ausente	Presente em menos de 1/3 do focinho	Presente em mais de 1/3 do focinho
Lesões em focinho	Ausente	Lesão mucosa inicial	Grande lesão ulcerada
Tamanho do baço	Não palpável	Palpável	-
Onicogribose	Ausente	Discreto aumento	Aumento expressivo
Alopecia	Ausente	Focal	Em mais de 1/3 do corpo
Dermatite furfurácea	Ausente	Focal	Em mais de 1/3 do corpo
Linfadenomegalia	Ausente	Um ou dois linfonodos aumentados no mesmo par	Linfonodos aumentados em pares diferentes

### 6.1.3 Exame histológico

As amostras de baço e fígado foram fixadas em formalina ácida, desidratadas em álcool, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. As secções histológicas foram feitas com a espessura de 4,0 µm e coradas pela hematoxilina-eosina (H&E), para análise em microscopia óptica convencional. Como parâmetros de análise para a classificação da organização da polpa branca esplênica utilizamos os critérios previamente descritos por Santana e colaboradores (2008). Resumidamente: (a) bem organizado, com bainha peri-arteriolar de linfócitos distinta, centro germinativo, zona do manto e zona marginal, (b) levemente desorganizado, com alterações hiperplásicas ou hipoplásicas levando a uma perda de definição dos limites entre as regiões da polpa branca, (c) moderadamente a extensivamente desorganizado, quando a polpa branca era evidente, mas as suas regiões eram pobremente individualizadas ou indistintas, ou quando a estrutura folicular mal era distinta da polpa vermelha e das áreas de células T.

Para o exame histológico do fígado, levamos em consideração as seguintes alterações: presença de inflamação portal, inflamação perivenular central, hipertrofia de células de Kupffer, hiperplasia de células de Kupffer, linfocitose intrasinusoidal, agregados de células inflamatórias nos sinusóides, congestão e dilatação de sinusóides, granulomas em espaço porta, granulomas intrassinusoidais, esteatose, balonização, necrose e apoptose hepatocelulares.

#### 6.1.3.1 *Classificação dos granulomas*

Foi feita a avaliação semi quantitativa da frequência dos granulomas, sendo a frequência classificada em discreta, moderada e intensa. Os granulomas foram classificados como descrito por Tiwananthagorn e colaboradores (2012).

#### 6.1.4 Imunoistoquímica (IHQ)

Os procedimentos imunoistoquímicos utilizados para os propósitos do estudo estão resumidos na Tabela 8. Foram avaliados os seguintes marcadores celulares:

- CD3: marcador de células pan-T.
- CD4: marcador de células T dos subtipos Th1 e Th2
- CD163: marcador expresso exclusivamente em monócitos e macrófagos. Funciona como um receptor regulado por fase aguda envolvido na depuração e endocitose de complexos de hemoglobina / haptoglobina por macrófagos.
- MAC387: marcador de granulócitos, monócitos e macrófagos teciduais.

A reação para o CD4 foi realizada em cortes de tecido congelado. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente durante 5 minutos, em seguida foram imersas em etanol absoluto durante 2 minutos e deixadas para secar. Quando secas, as secções foram lavadas com TBS (solução salina tamponada com Tris 0,005 M, pH 7,6) e a atividade de peroxidase endógena foi extinta por imersão de lâminas numa solução de peróxido de hidrogénio a 3% em metanol (VWR, Lutterworth, Leicestershire, UK), sendo lavadas em água corrente em seguida, não sendo necessária exposição de epítomos. Após a lavagem em água corrente, a coloração prosseguiu seguindo o mesmo protocolo utilizado com as amostras de tecido fixadas em formalina (FFPE). Todas as outras técnicas de imunomarcção foram realizadas em amostras de tecido fixadas em formalina. Antes da IHQ, todas as secções foram cortadas (4µm) e colocadas em lâminas tratadas com Vectabond (Vector Laboratories, Peterborough, RU), desparafinizadas e desidratadas. A atividade da peroxidase endógena foi extinta por imersão de lâminas numa solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (VWR, Lutterworth, Leicestershire, UK). Depois de enxaguar em água corrente, a exposição dos epítomos foi realizada utilizando protocolos mediados por calor ou enzima (Tabela 8). Após exposição de epítomo mediada por calor, as lâminas foram arrefecidas em seus tampões à temperatura ambiente (T.A.) antes de serem lavadas em água corrente, enquanto as lâminas tratadas com enzima foram montadas em placas de cobertura Sequenza (Shandon Scientific Loughborough, UK)

para imunomarcção. Foram incluídos um controle negativo e um controle positivo para cada reação.

Os anticorpos primários foram então aplicados durante 60 min à T.A. ou 18-20 h (durante a noite) a 4 °C (consultar Tabela 8). Após duas lavagens com tampão (TBS, solução salina tamponada com Tris 0,005 M, pH 7,6), as lâminas foram incubadas com um anticorpo secundário biotilado (Kit Ultra-Sensível de Coloração com Peroxidase ABC, Fisher Scientific, UK) durante 30 min à T.A., seguido de duas lavagens com tampão. A ligação de anticorpos primários e secundários foi amplificada utilizando o conjugado de avidina-biotina-peroxidase (Kit Ultra-Sensível de Coloração com Peroxidase ABC, Fisher Scientific, Reino Unido) e visualizada utilizando NovaRED (Kit de Substrato de Novafica VECTOR NovaRED (HRP)). O conjugado não ligado foi removido antes da aplicação NovaRED com duas lavagens com tampão. As lâminas foram então enxaguadas em água purificada, contra coradas em hematoxilina de Harris, "azuladas" em água corrente, desidratadas em álcool absoluto e xileno, antes de serem cobertas com tampão com Ftalato de Di-N-Butilo em Xileno (DPX). Foram introduzidos controles adequados em todas as reações IHQ, substituindo anticorpos primários com controles de isotipo de imunoglobulina correspondentes.

Tabela 8. Detalhes do procedimento de imunoistoquímica

Anticorpo e diluição	Tipo / Classe	Fornecedor	Exposição antigênica			Incubação de anticorpo primário		Diluição do anticorpo secundário
			H 1	H 2	E	R.T.	O/N	
<b>CD3</b> 1/500	Coelho Policlonal	Dako <sup>b</sup> A0452			x		x	Cabra Anti-coelho 1/1000
<b>MAC 387</b> 1/600	Camundongo Monoclonal	Bio-Rad <sup>a</sup> MCA874G			x		x	Cavalo Anti-camundongo 1/200
<b>CD163</b> 1/75	Coelho Polyclonal	Cusabio <sup>c</sup> CSB-PA934682	x				x	Cabra Anti-coelho 1/1000
<b>CD4</b> 1/100	Rato Monoclonal	Bio-Rad <sup>a</sup> MCA1038GA	NA	NA	NA		x	Cabra Anti-rato 1/200

Exposição de antigênica: E = proteinase K (Dako S3004), a T.A., por 10 minutos, H 1 = heat-mediated; Dako Target Retrieval Solution 1x (Dako S1699), pH 6.0 a 6.20, por 20 minutos a 97°C, arrefecida a T.A. por 10 minutos e lavada em água corrente por 10 minutos. H 2= heat-mediated; Dako Target Retrieval Solution 1x (Dako S2367), pH 9.0, por 20 minutos a 97°C, arrefecida a T.A. por 10 minutos e lavada em água corrente por 10 minutos. Normal serum block = Pierce™ Protein-Free (TBS) Blocking Buffer (prod# 37585), por 20 min a T.A. (19–23°C). Incubação do anticorpo primário: T.A. = 60 min a T.A. (19–23°C), O/N = 18–20 h em refrigerador (+4°C).

<sup>a</sup>Oxford, UK.

<sup>b</sup>Ely, UK.

<sup>c</sup>College Park, MD, USA.

### **6.1.5 Morfometria**

Nas lâminas coradas em H&E, foram feitas 20 imagens de cada secção. Foram medidas as áreas totais das imagens e as áreas de cada granuloma. Foram calculadas as porcentagens das áreas ocupadas por granulomas, número de granulomas por secção, e a média de granulomas por mm<sup>2</sup>.

Nas lâminas coradas pelo método de imunoistoquímica, foram feitas 10 imagens de cada secção, nas quais foi desenhada uma ROI (region of interest) ao redor dos granulomas, e então foi medida a área da ROI ocupada pela cor definida como marcação positiva (object area fraction). Foi calculada a média dos valores obtidos nas imagens de cada animal. As lâminas foram observadas utilizando o microscópio Nikon Eclipse Ci-S (Nikon Instruments, Inc., EUA) e as imagens foram capturadas e analisadas usando o software Nikon NIS Elements Br 4.20.00 (Nikon).

### **6.1.6 Microdissecção por captura a laser (LCM)**

Secções de tecido congelado, com 10 µm de espessura, foram cortadas em criostato e colocadas em lâminas com membrana da Leica, PEN-Membrane 2,0 µm (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Foram feitas oito secções de cada tecido para se obter ácido nucleico suficiente para as subseqüentes análises. As secções foram secas ao ar e fixadas em etanol a 70%. Após a fixação, elas foram coradas com hematoxilina de Harris durante 20 segundos, lavadas em água destilada por 10 segundos, e secas dentro de capela de fluxo laminar. A LCM foi realizada em um microscópio Leica LMD6500. Os granulomas foram identificados microscopicamente antes de serem isolados e recolhidos em tubos de PCR RNase free (Greiner bio-one, Stroudwater, UK). Secções sem granulomas do parênquima hepático foram também dissecadas e recolhidas para uso como tecido de controle. Os tubos foram selados e armazenados a - 80°C até posterior processamento.

### 6.1.7 Extração de RNA e PCR em tempo real

O RNA total foi extraído utilizando o RNAqueous-Micro Kit [Ambion (Europe) Ltd. Cambridge, RU] de acordo com o protocolo do fabricante: procedimento de isolamento de RNA a partir de amostras de LCM, incluindo o tratamento opcional com DNase I e passo de inativação de DNase. O RNA total foi convertido em cDNA utilizando o Kit de Síntese de cDNA SuperScript VILOTM (Applied Biosystems, Warrington, UK) seguindo o protocolo do fabricante. Os rendimentos e a qualidade de RNA e cDNA foram determinados utilizando um NanoDrop. Os tubos foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes da realização do qPCR como descrito anteriormente (LIMA, 2014). Realizaram-se as reações para análise de 6 transcritos de mRNA, com primer forward, primer reverse e sequências de sonda apresentadas na Tabela 9. O gene de referência utilizado para o controle endógeno foi 18S. As placas foram centrifugadas antes de serem executadas numa máquina Prime Pro 48 Real-time qPCR (Techne). A amplificação foi calculada utilizando o  $2^{-\Delta\text{Cq}}$  (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 9. Sequências dos primers usados no qPCR

Gene alvo	Primer Sonda	Sequência (5'-3')	Referência
18S	Primer forward	GCAGAATCCACGCCAGTATAA	
	Primer reverse	TCTTCAGTCTCTCCAGGTCTTC	
	Sonda	AAAGGATGGAAAGTACAGCCAGGTCC	
IFN- $\gamma$	Primer forward	GCGCAAGGCGATAAATGAAC	Fujiwara et al., 2003
	Primer reverse	CTGACTCCTTTTCCGCTTCT	
	Sonda	TGATGAATGATCTCTACCAAGATCCAACC	
TNF- $\alpha$	Primer forward	ACCCATGTGCTCCTCACC	Melo et al., 2013
	Primer reverse	AGGGCTCTTGATGGCAGAGA	
	Sonda	CGCTTCGCCGCTCCTACCA	
TGF- $\beta$	Primer forward	CTGGAGTCGTGAGGCAGTG	Melo et al., 2013
	Primer reverse	GCAGTGTGTTATCTTTGCTGTCA	
	Sonda	TTTCGCCTCAGTGCCCACTG	
IL-10	Primer forward	GCGACGCTGTCACCGATT	Sanchez-Robert et al. 2008
	Primer reverse	CTGGAGCTTACTAAATGCGCTCTT	
	Sonda	ACCGCCTTGCTCTT	
IL-12	Primer forward	CAGCAGAGAGGGTCAGAGTGG	Melo et al., 2013
	Primer reverse	ACGACCTCGATGGGTAGGC	
	Sonda	TGGAGTGTACAGGAGGGCAGTGC	

### 6.1.8 Determinação do perfil de imunoglobulinas

A determinação do perfil de imunoglobulinas foi realizada utilizando o método de ELISA, de acordo com o protocolo descrito por Reis e colaboradores (2006). As características de diluição do soro, diluição do conjugado, e tempo de incubação do conjugado estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Detalhes do procedimento de ELISA

Isotipo	Diluição do soro	Diluição do conjugado	Incubação do conjugado	
			Temperatura	Tempo
IgA	1:80	1:1000	4º c	18 a 22 horas
IgE	1:80	1:1000	4º c	18 a 22 horas
IgG Total	1:160	1:16000	37º c	45 minutos
IgG 1	1:160	1:4000	37º c	45 minutos
IgG 2	1:160	1:16000	37º c	45 minutos
IgM	1:160	1:1000	37º c	45 minutos

### 6.1.9 Análise e expressão dos resultados

Os dados foram analisados utilizando os programas STATA Statistics/Data Analysis 11.0, GraphPad Prism 5.02 e Excel. Os resultados são expressos em valores absolutos ou relativos, em tabelas associadas a gráficos. A significância das diferenças entre os grupos foi testada usando o teste de Kruskal-Wallis. Para diferenças significativas, a diferença entre dois grupos foi identificada por meio do teste de comparação múltipla de Dunn. Para as comparações envolvendo proporções, foi utilizado o teste de probabilidade exato de Fisher. O valor crítico para significância dos resultados foi estabelecido para  $p < 0,05$ .

## 6.2 RESULTADOS

### 6.2.1 Características gerais da amostra utilizada na avaliação dos granulomas hepáticos:

As principais características dos 24 animais incluídos neste trabalho estão apresentadas na Tabela 11. Foi observada positividade no ELISA em 23 (96%) dos animais, na cultura de aspirado esplênico em 19 (83%) dos animais e no PCR em 23 animais (96%). Os sinais clínicos associados à leishmaniose visceral canina estavam presentes em 18 (75%) animais, sendo destes 11 (46%) com doença leve e 7 (29%) com doença grave. Entre os 24 cães, 10 (42%) tiveram baço tipo 1 (com polpa branca do baço organizado); 9 (37%) tiveram baço tipo 2 (com polpa branca ligeiramente desorganizado); e 5 (21%) tiveram baço tipo 3 (com polpa branca moderada a intensamente desorganizado, Tabela 11).

Tabela 11. Características gerais dos animais utilizados na avaliação dos granulomas.

	Frequência	(%)
<b>N</b>	24	(100)
<b>Gênero</b>		
Macho	11	(54)
Fêmea	13	(46)
<b>Idade</b>		
0 a 2 Anos	4/23	(17)
3 a 4 anos	8/23	(35)
5 a 7 anos	7/23	(30)
Mais de 7 anos	4/23	(17)
<b>Porte</b>		
Pequeno	7	(29)
Médio	10	(42)
Grande	7	(29)
<b>Baço</b>		
Tipo 1	10	(42)
Tipo 2	9	(37)
Tipo 3	5	(21)
<b>Classificação clínica</b>		
Subclínico	6	(25)
Doença leve	11	(46)
Doença grave	7	(29)
<b>ELISA</b>		
Negativo	1	(4)
Positivo	23	(96)
<b>Cultura</b>		
Negativo	4	(17)
Positivo	19	(83)
<b>PCR</b>		
Negativo	1	(4)
Positivo	23	(96)

### **6.2.2 Alterações histológicas no fígado dos animais utilizados na avaliação dos granulomas hepáticos:**

As principais alterações histológicas observadas nos animais estudados são apresentadas na tabela 12. As alterações mais frequentes foram inflamação nos espaços porta (100%), granulomas intrassinusoidais (100%), hiperplasia de células de Kupffer (100%), hipertrofia de células de Kupffer (100%), inflamação em torno de veia central (88%) e agregados intrassinusoidais (83%). As inflamações portais e perivasculares centrais eram compostas por infiltrado predominantemente linfoplasmocitário. Os granulomas observados nos sinusóides eram compostos por células de Kupffer, por vezes parasitadas, linfócitos e, em alguns casos, plasmócitos, com variação no tamanho e no grau de organização, havendo desde agrupamentos pouco organizados de células até granulomas maduros, circunscritos e bem organizados (figura 9).

Os animais com inflamação portal moderada apresentaram uma maior quantidade de parasitas no fígado quando comparados com os animais com inflamação portal discreta ( $p= 0.0264$ , teste Mann-Whitney). Os animais com frequência moderada ( $p= 0.0141$ ) e intensa ( $p= 0.0463$ ) de granulomas intrassinusoidais apresentaram maior quantidade de parasitas no fígado em relação aos animais com frequência discreta (teste Mann-Whitney).

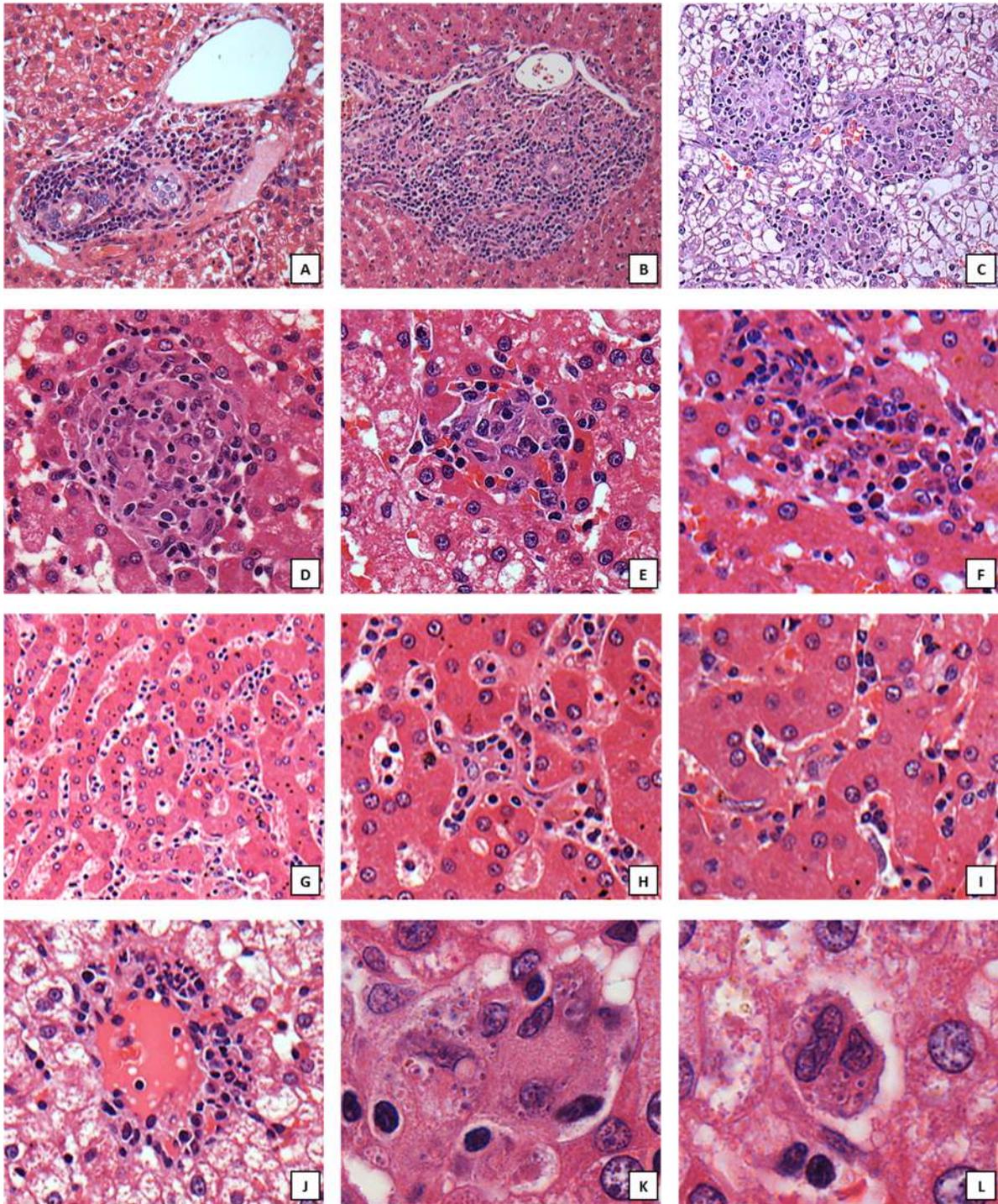


Figura 9: Alterações histológicas no fígado dos animais utilizados na avaliação dos granulomas. A: Inflamação portal (40x); B: granuloma portal (40x); C: granulomas intrassinusoidais bem organizados (40x); D: granuloma intrassinusoidal bem organizado (40x); E: granuloma intrassinusoidal mal organizado (40x); F: agregado desorganizado de células inflamatórias em sinusóide (40x); G: linfocitose intrassinusoidal, hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer (20x); H: agregado intrassinusoidal de células inflamatórias (40x); I: hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer (40x); J: inflamação em torno de veia centrolobular (40x); K: presença de parasitos dentro de macrófagos em pequenos agregados desorganizados (100x); L: presença de parasitos dentro de sinusóide (100x).

Tabela 12. Alterações histológicas no fígado dos animais utilizados na avaliação dos granulomas hepáticos.

	Discreto	Moderado	Intenso	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Inflamação portal	13 (54)	7 (29)	4 (17)	24 (100)
Frequência de granuloma intrassinusoidal	14 (58)	5 (21)	5 (21)	24 (100)
Hiperplasia de células de Kupffer	8 (33)	12 (50)	4 (17)	24 (100)
Hipertrofia de células de Kupffer	10 (42)	10 (42)	4 (16)	24 (100)
Frequência de granuloma portal	3 (12.5)	1 (4)	3 (12.5)	7 (29)
Linfocitose intrassinusoidal	13 (54)	5 (21)	1 (4)	19 (21)
Congestão de sinusóides	1 (4)	1 (4)	0 (0)	2 (8)
Dilatação de sinusóides	2 (8)	0 (0)	0 (0)	2 (8)
Frequência de agregados intrassinusoidais	12 (50)	8 (33)	0 (0)	20 (83)
Inflamação perivascular central	16 (67)	4 (17)	1 (4)	21 (88)
Esteatose	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Balonização	1 (4)	0 (0)	1 (4)	2 (8)
Necrose de hepatócitos	0 (0)	1 (4)	0 (0)	1 (4)

### 6.2.3 Fenótipo das células presentes nos granulomas hepáticos

#### 6.2.3.1 Composição celular dos granulomas hepáticos com relação ao tamanho e frequência de granulomas intrassinusoidais:

A associação observada entre os diferentes tipos celulares e tamanho e frequência de granulomas intrassinusoidais está descrita na figura 11. Os granulomas foram classificados com relação ao seu tamanho, sendo classificados como pequenos e médios. Os granulomas variaram desde estruturas compostas por células de Kupffer, por vezes parasitadas, além de linfócitos e por vezes plasmócitos, com baixo grau de organização, até estruturas compostas por células de Kupffer organizadas de maneira concêntrica, rodeadas por linfócitos e raros plasmócitos (figura 10).

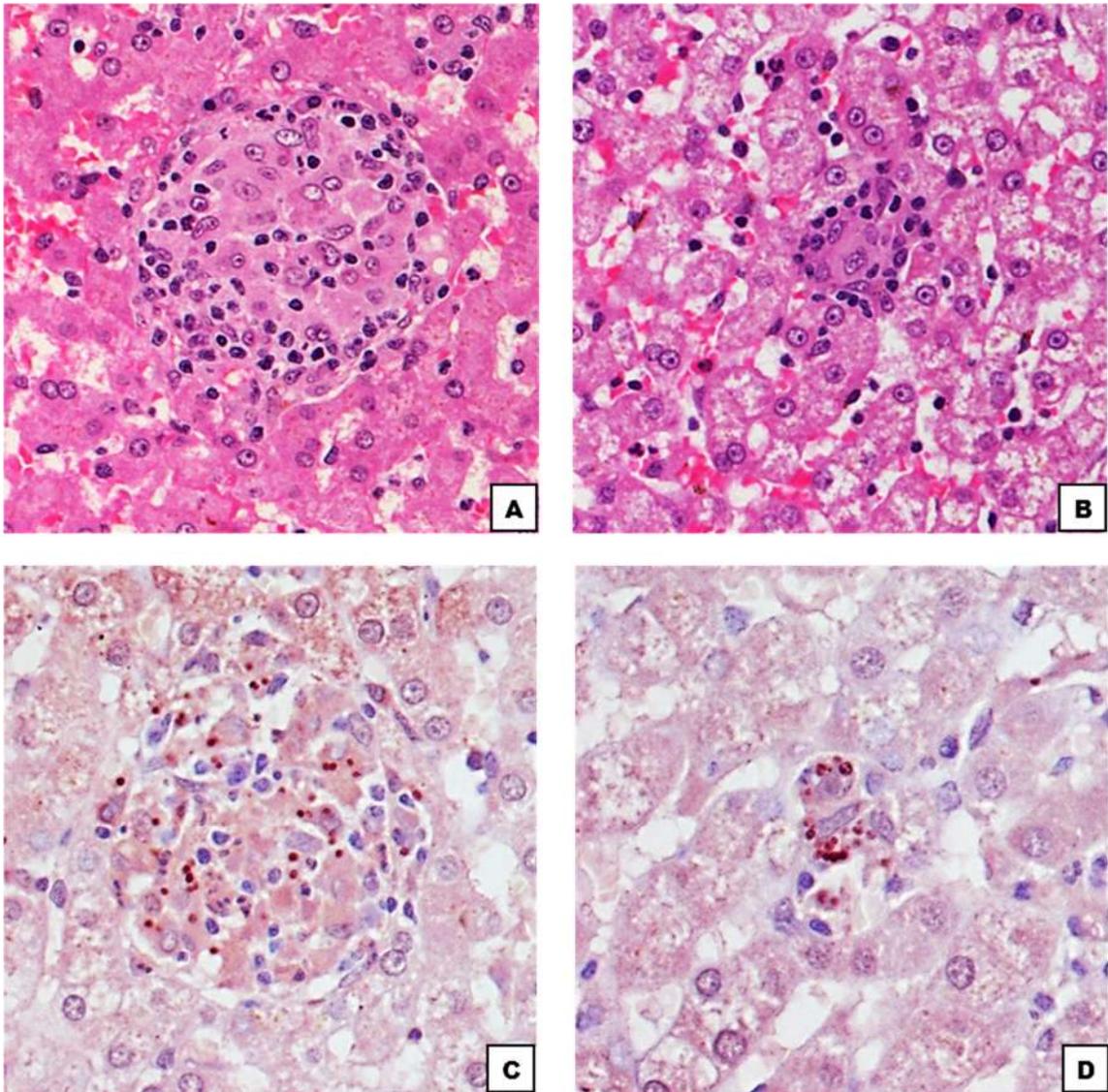


Figura 10: Granulomas em fígado de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados. A: granuloma organizado (40x, H&E); B: granuloma desorganizado (40x, H&E); C: presença de parasitos em granuloma organizado (40x, imunohistoquímica anti-*Leishmania*); D: presença de parasitos em granuloma desorganizado (40x, imunohistoquímica anti-*Leishmania*).

A quantificação das células foi feita de maneira relativa, levando em consideração o tamanho dos granulomas. Os valores obtidos se referem à porcentagem da área do granuloma ocupada pelas células marcadas pelo procedimento de imunohistoquímica.

Foi observada uma maior proporção de células CD3 positivas nos animais com granulomas pequenos, em relação aos animais com granulomas médios ( $p= 0.0037$ ). Com relação às MAC387 positivas, estas foram observadas em maior proporção nos

animas com granulomas médios, em relação aos animais com granulomas pequenos ( $p= 0.0132$ , teste t não pareado, figura 9). Não houve diferenças em relação ao grau de organização dos granulomas, bem como com relação à frequência de granulomas intrassinusoidais. Também não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos demais marcadores (CD4 e CD163).

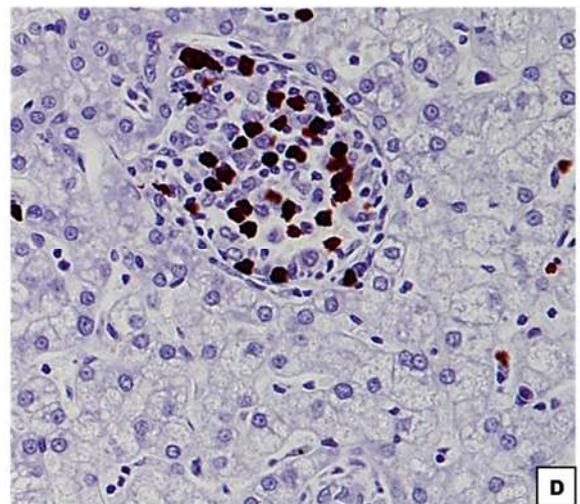
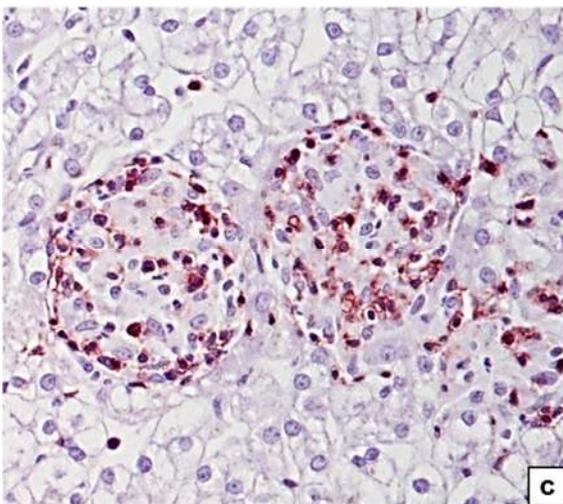
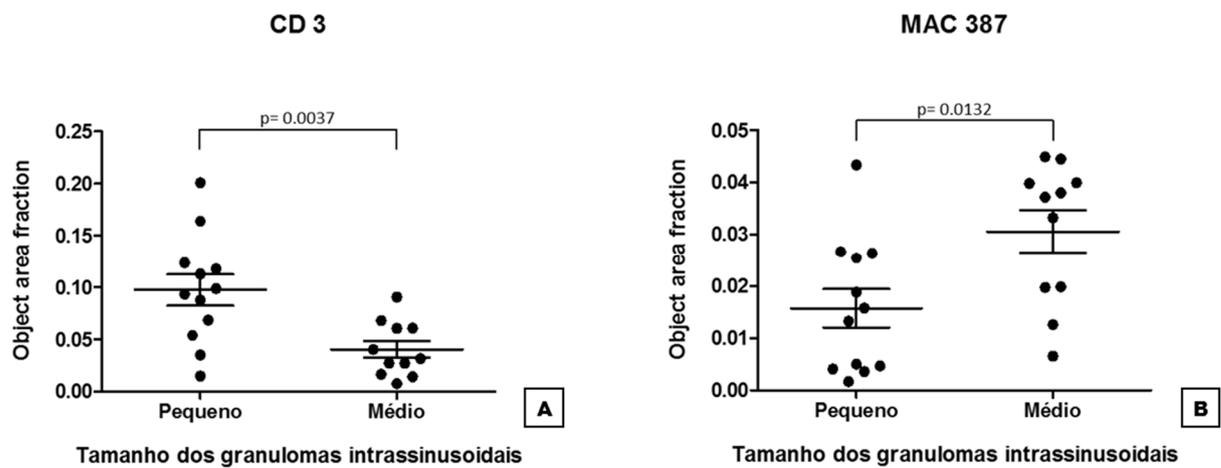


Figura 11: Composição dos granulomas com relação ao tamanho e frequência de granulomas intrassinusoidais. A: associação entre presença de células CD3 positivas e tamanho de granulomas intrassinusoidais; B: associação entre presença de células MAC 387 positivas e tamanho de granulomas intrassinusoidais; C: células CD3 positivas em granuloma (20x, imunohistoquímica anti-CD3); D: células MAC387 positivas em granuloma (20x, imunohistoquímica anti-MAC 387).

### 6.2.3.2 Composição celular dos granulomas hepáticos com relação à organização da polpa branca esplênica:

A associação observada entre os diferentes tipos celulares e a organização da polpa branca esplênica está descrita na figura 12.

Foi observada maior frequência de células CD4 ( $p= 0.0109$ ) e CD163 positivas ( $p= 0.0127$ ) nos animais com baço desorganizado em relação aos demais (teste Mann-Whitney, figura 12). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos demais marcadores (CD3 e MAC387).

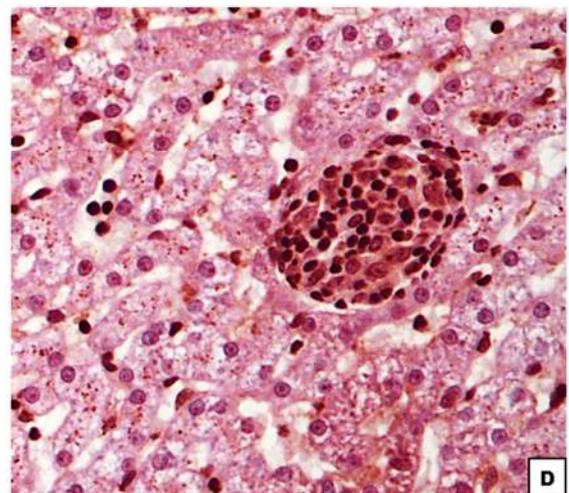
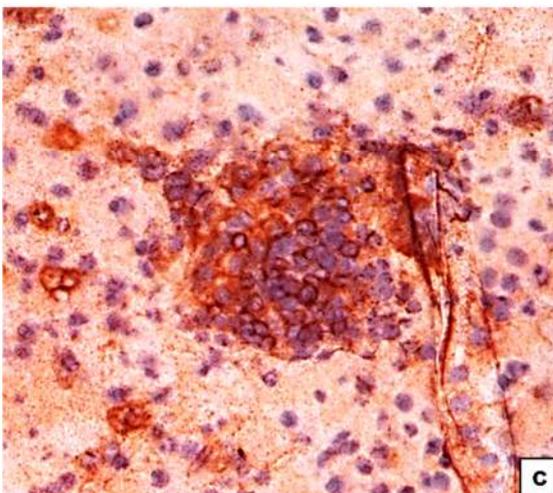
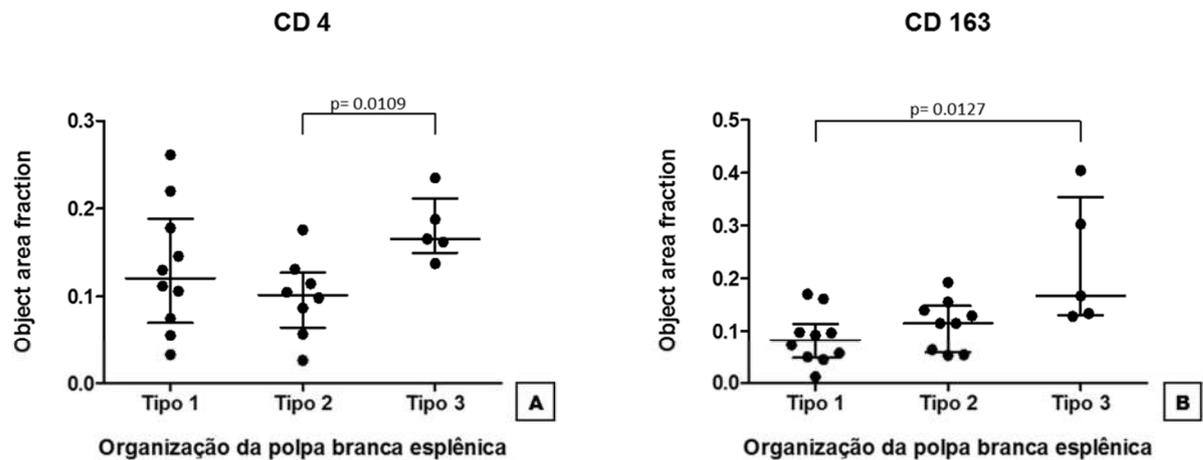


Figura 12: Composição dos granulomas com relação à organização da polpa branca esplênica. A: associação entre presença de células CD4 positivas e organização da polpa branca esplênica; B: associação entre presença de células CD163 positivas e organização da polpa branca esplênica; C: células CD4 positivas em granuloma (20x, imunohistoquímica anti-CD4); D: células CD163 positivas em granuloma (20x, imunohistoquímica anti-CD163).

## 6.2.4 Perfil de citocinas expressas nos granulomas

### 6.2.4.1 Associação entre tamanho de granulomas e expressão de citocinas:

A associação observada entre o tamanho dos granulomas intrassinusoidais e a expressão de citocinas está mostrada na figura 13.

Granulomas intrassinusoidais de tamanho médio exibiram uma maior expressão de TNF- $\alpha$  ( $p= 0.0392$ , teste Mann Whitney) e TGF- $\beta$  ( $p= 0.0220$ , teste t não pareado), quando comparados com os granulomas de tamanho pequeno (figura 13). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação a IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12 e o tamanho dos granulomas.

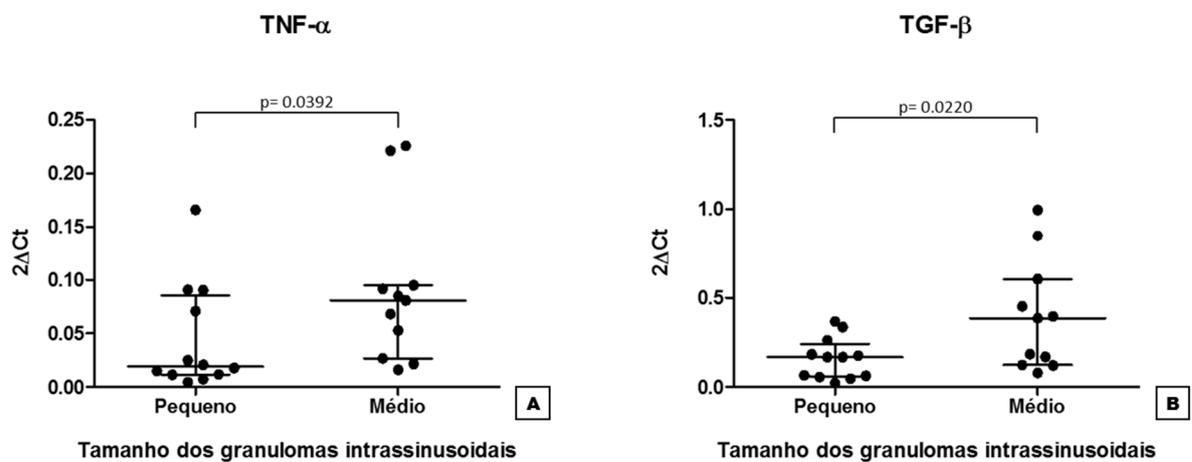


Figura 13: Associação entre tamanho de granulomas e expressão de citocinas. A: associação entre expressão de TNF- $\alpha$  e tamanho dos granulomas; B: associação entre expressão de TGF- $\beta$  e tamanho dos granulomas.

#### 6.2.4.2 Correlação entre presença de *Leishmania* nos granulomas e expressão de citocinas:

A correlação observada entre a presença de *Leishmania* nos granulomas e expressão de citocinas está descrita na figura 14.

Foi observada uma correlação positiva entre a produção de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (teste Spearman) nos granulomas, e a quantidade de *Leishmania* dentro dos granulomas, mostrando que granulomas mais parasitados têm uma maior produção de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , quando comparados com granulomas menos parasitados. Não foi observada correlação entre a produção de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12 e a presença de *Leishmania* nos granulomas.

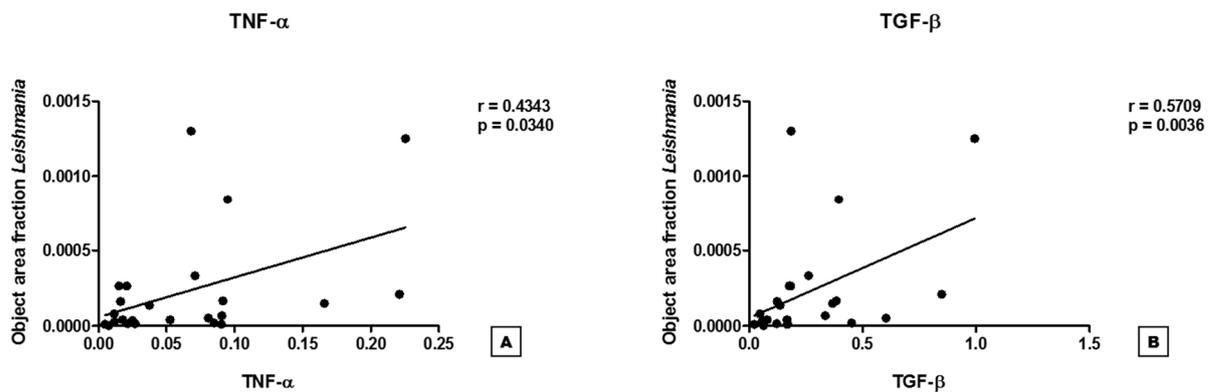


Figura 14: Correlação entre presença de *Leishmania* nos granulomas e expressão de citocinas. A: correlação entre expressão de TNF- $\alpha$  e a quantidade de *Leishmania* dentro dos granulomas. B: correlação entre expressão de TGF- $\beta$  e a quantidade de *Leishmania* dentro dos granulomas

## 6.2.5 Perfil de Imunoglobulinas

### 6.2.5.1 Perfil de imunoglobulinas com relação a frequência de granulomas intrassinusoidais:

A associação observada entre o perfil de imunoglobulinas e frequência de granulomas intrassinusoidais está mostrada na figura 15.

Animais com maior frequência de granulomas intrassinusoidais apresentaram maior produção de IgA, IgE, IgG Total e IgG 2 em relação aos animais com granulomas intrassinusoidais em menor frequência. Animais com frequência moderada de granulomas intrassinusoidais apresentaram maior produção de IgG 1 em relação aos animais com granulomas intrassinusoidais em menor frequência (teste Mann-Whitney, figura 15). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação a IgM.

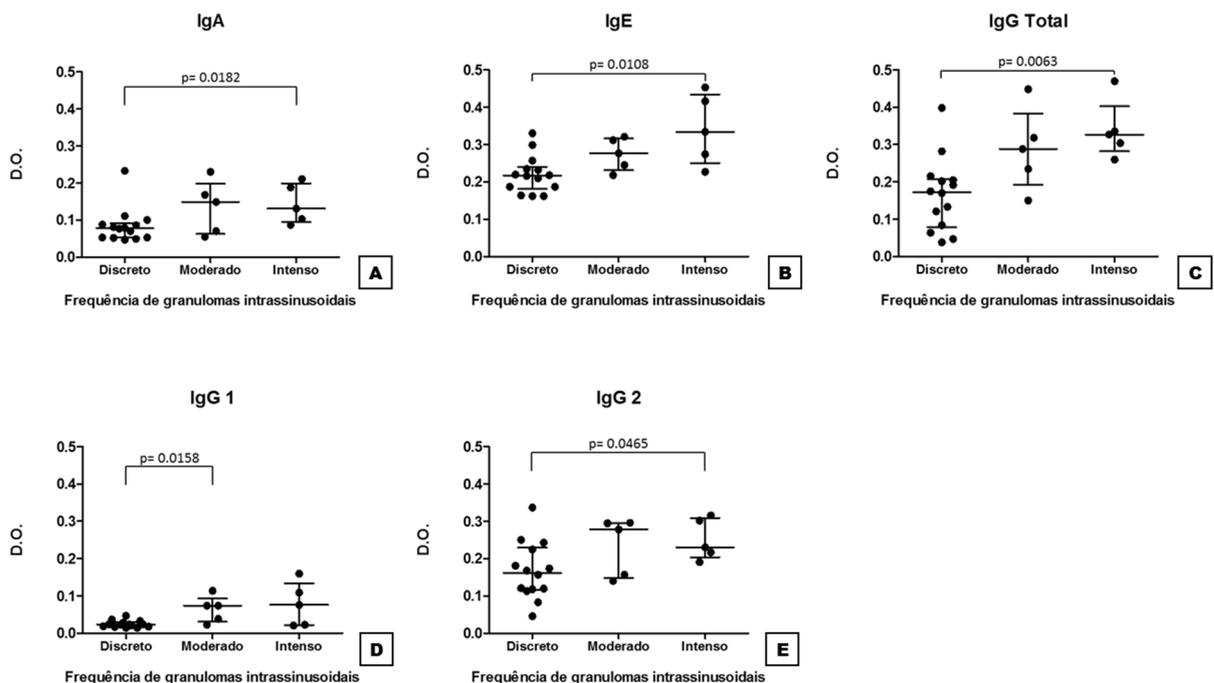


Figura 15: Perfil de imunoglobulinas com relação à frequência de granulomas intrassinusoidais. A: associação entre a produção de IgA e frequência de granulomas intrassinusoidais; B: associação entre a produção de IgE e frequência de granulomas intrassinusoidais; C: associação entre a produção de IgG Total e frequência de granulomas intrassinusoidais; D: associação entre a produção de IgG 1 e frequência de granulomas intrassinusoidais; E: associação entre a produção de IgG 2 e frequência de granulomas intrassinusoidais.

### 6.2.5.2 Correlação entre produção de imunoglobulinas e frequência de granulomas intrassinusoidais:

Foi observada uma correlação positiva entre a produção de IgA, IgE, IgG total e IgG 2, o número médio de granulomas por secção de cada animal (teste de Pearson, figura 16), e o número de granulomas por mm<sup>2</sup> em cada animal (teste de Pearson, figura 17). Não foi observada correlação entre a produção de IgG 1 e IgM e a frequência de granulomas.

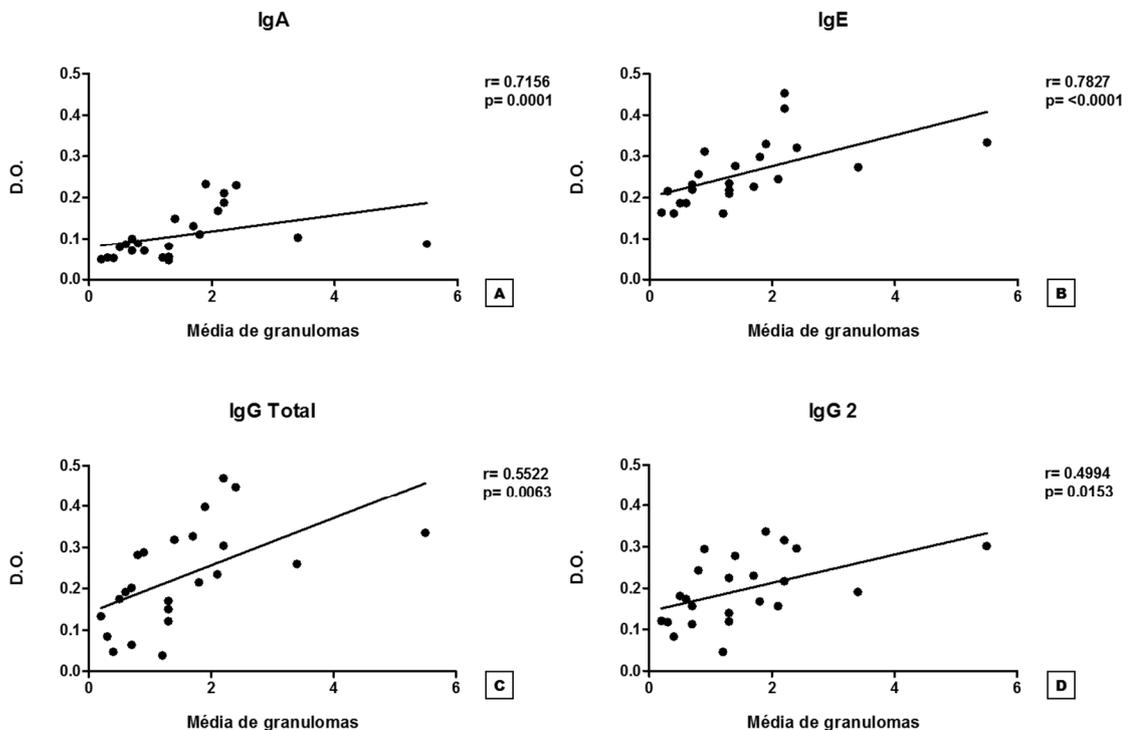


Figura 16: Correlação entre produção de imunoglobulinas e a média de granulomas intrassinusoidais por amostra. A: correlação entre a produção de IgA e média de granulomas intrassinusoidais por animal; B: correlação entre a produção de IgE e média de granulomas intrassinusoidais por animal; C correlação entre a produção de IgG Total e média de granulomas intrassinusoidais por animal; D: correlação entre a produção de IgG 2 e média de granulomas intrassinusoidais por animal.

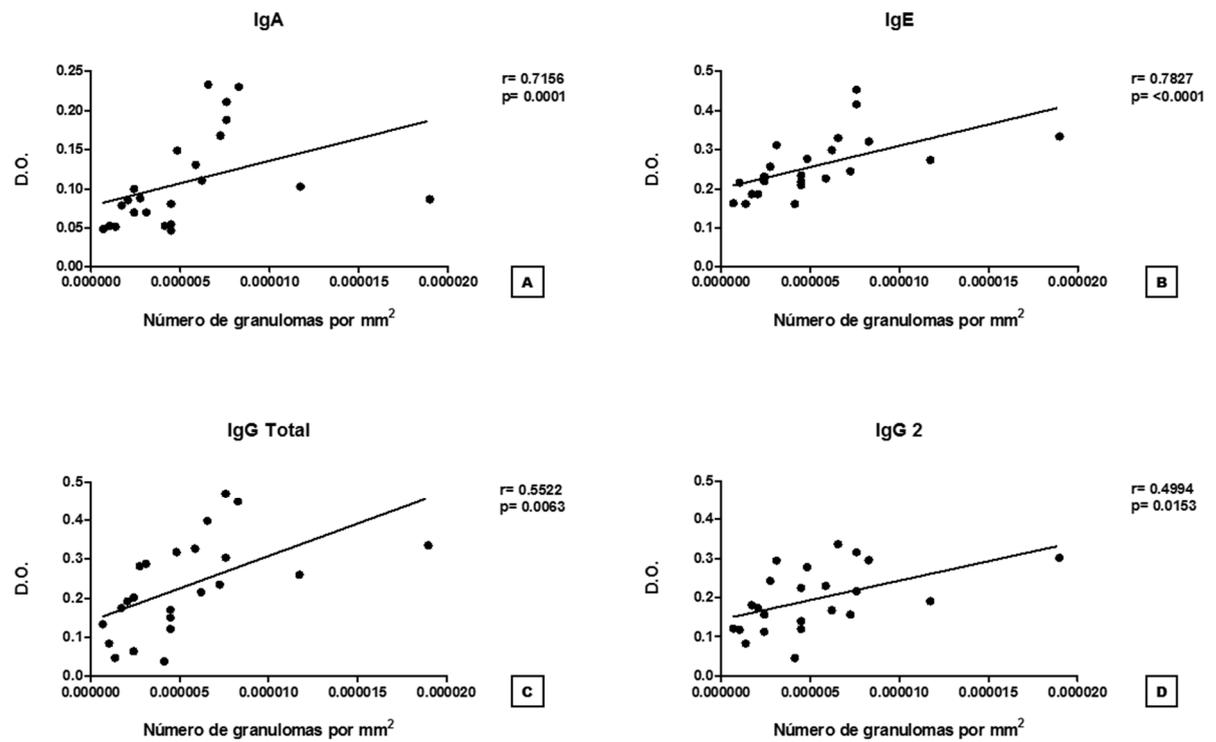


Figura 17: Correlação entre produção de imunoglobulinas e o número de granulomas intrassinusoidais por mm<sup>2</sup>. A: correlação entre a produção de IgA e número de granulomas intrassinusoidais por mm<sup>2</sup>; B: correlação entre a produção de IgE e número de granulomas intrassinusoidais por mm<sup>2</sup>; C: correlação entre a produção de IgG Total e número de granulomas intrassinusoidais por mm<sup>2</sup>; D: correlação entre a produção de IgG 2 e número de granulomas intrassinusoidais por mm<sup>2</sup>.

### 6.2.5.3 Perfil de imunoglobulinas com relação ao status clínico, organização dos granulomas e à organização da polpa branca esplênica:

A associação observada entre os diferentes perfis de imunoglobulinas e a organização da polpa branca esplênica está descrita na figura 18.

Foi observada uma maior produção de IgG total nos animais com doença grave, quando comparados com os animais com quadro subclínico. Foi observada uma maior produção de IgM nos animais com baço organizado, em relação aos animais com baço desorganizado (teste Mann-Whitney, figura 18).

Não houve diferença estatisticamente significativa na produção das demais imunoglobulinas em relação ao status clínico dos animais estudados. Além disso, não foi observada diferença na produção das demais imunoglobulinas em relação à organização da polpa branca esplênica. Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de imunoglobulinas em relação à organização dos granulomas.

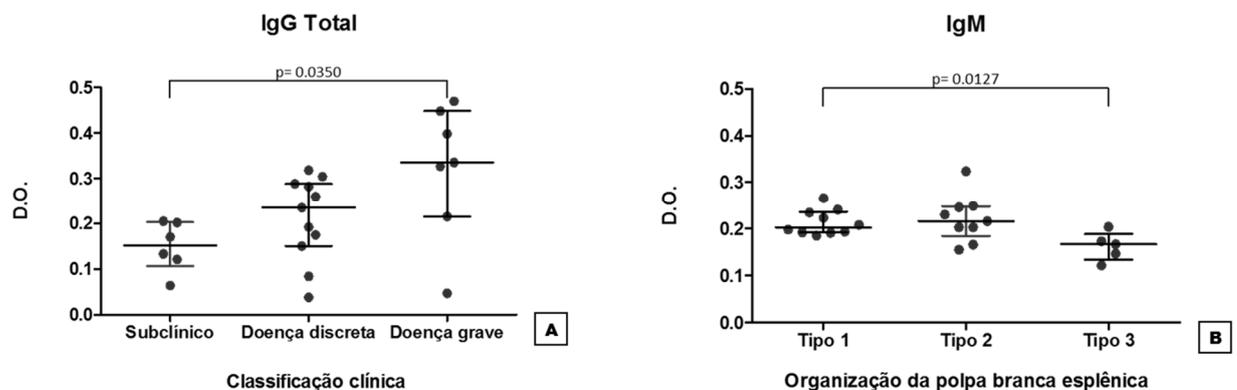


Figura 18: Perfil de imunoglobulinas com relação à organização da polpa branca esplênica e classificação clínica. A: associação entre a produção de IgG Total e status clínico; B: associação entre a produção de IgM e organização da polpa branca esplênica.

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos que animais com infecção ativa por *Leishmania sp.* apresentam maior frequência de alterações inflamatórias no fígado. Essas alterações têm correlação, também com a gravidade das manifestações clínicas e com o grau de desorganização da polpa branca do baço, o que reforça seu significado. Além disso, mostramos que existe uma associação entre as alterações inflamatórias e as alterações hematológicas e bioquímicas avaliadas. Observamos, ainda, uma associação entre a intensidade dessas alterações inflamatórias e a carga parasitária no baço dos animais. Vale ressaltar que, enquanto alterações como inflamação portal e perivascular e presença de granulomas em maior quantidade estão relacionadas com maior carga parasitária, o inverso é verificado em relação à linfocitose intrassinusoidal, formação de agregados intrassinusoidais de células inflamatórias mononucleares e hipertrofia de células de Kupffer, sugerindo uma relação entre essas alterações e uma resposta de controle do parasitismo por parte do hospedeiro.

Em relação ao estudo dos granulomas, nossos dados mostram que granulomas pequenos possuem uma maior proporção de células CD3<sup>+</sup> (células T), enquanto que granulomas médios têm maior proporção de células MAC387<sup>+</sup> (macrófagos). Além disso, animais com baço desorganizado têm granulomas com uma maior proporção de células CD4<sup>+</sup> (células T) e células CD163<sup>+</sup> (macrófagos). Mostramos também que granulomas médios expressam mais TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  do que granulomas pequenos, e que existe uma correlação positiva entre a quantidade de parasitas no granuloma e a expressão de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ .

No que se refere à resposta humoral, mostramos que cães com mais granulomas produzem mais IgA, IgE, IgG total, IgG 1 e IgG 2. Mostramos também que cães com doença grave produzem mais IgG total, e que cães com baço desorganizado produzem mais IgM. Em conjunto, nossos dados sugerem que a leishmaniose visceral canina se associa a alterações histológicas no fígado que refletem o quadro clínico do animal.

Na LVC a resposta imune pode variar de acordo com o órgão afetado. Em camundongos, a multiplicação do parasita no fígado ocorre nos primeiros 28 dias de infecção, sendo eliminados durante o mês seguinte. Já no baço e medula óssea a infecção progride para a cronicidade. Estas diferenças podem estar relacionadas com

a população celular e as vias regulatórias que participam deste processo em cada órgão (ENGWERDA e KAYE, 2000).

Em cães com LV, as alterações mais frequentemente descritas no fígado incluem presença de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos) intrassinusoidais, infiltrado inflamatório portal, predominantemente mononuclear, hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer, congestão sinusoidal, e granulomas (GONZALÉZ, 1988; BINHAZIM, 1992; OLIVEIRA, 1993; VALLADARES, 1997; SANCHEZ, 2004; RALLIS, 2005; GIUNCHETTI, 2008; MELO, 2008; MELO, 2009; PANGRAZIO, 2009; MICHELIN, 2011; TOPLU, 2011; MAIA E CAMPINO, 2011). No presente estudo, animais com infecção ativa apresentam mais inflamação portal e formação de agregados intrassinusoidais, além de um maior escore histológico, o que corrobora achados descritos previamente na literatura. Alterações semelhantes são descritas em humanos e modelos murinos (DUARTE e CORBETT, 1987; EL HAG, 1994; GOMES-PEREIRA, 2004; GUTIERREZ, 1984, MURRAY 2001).

Quando associamos a classificação clínica dos animais à presença de infecção ativa, os animais com infecção ativa e sintomáticos apresentam mais inflamação portal, hipertrofia de células de Kupffer, linfocitose intrassinusoidal e agregados intrassinusoidais. Além disso, têm maior chance de apresentar inflamação portal, hipertrofia de células de Kupffer, linfocitose intrassinusoidal e agregados, além de maior escore histológico global. Tais alterações têm sido descritas na literatura corroborando nossos achados, contudo, diferenças em relação à classificação clínica e à presença de infecção podem explicar pequenas diferenças observadas, como no caso de Giunchetti e colaboradores (2008), que descrevem uma maior frequência de hepatomegalia, inflamação capsular, inflamação portal, presença de granulomas intralobulares e hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer em animais sintomáticos, quando comparados com um grupo controle não infectado (GIUNCHETTI, 2008). Em nosso estudo, não houve comparação com animais controle não infectados.

Sánchez e colaboradores (2004) descrevem uma diferença nas alterações hepáticas entre cães sintomáticos e assintomáticos. Foi mostrado que cães assintomáticos exibiam granulomas hepáticos maduros e bem organizados, com área central de células de Kupffer cercadas por linfócitos. Em cães sintomáticos, muitas células de Kupffer repletas com parasitas foram observadas espalhadas por todo o

fígado juntamente com um infiltrado de células mononucleares profuso e desorganizado (SANCHÉZ, 2004). Contudo, em nosso estudo, o quadro observado difere do descrito por Sánchez em relação aos granulomas, uma vez que não observamos relação entre a presença e características morfológicas dos granulomas e as manifestações clínicas dos animais. Nossos achados se assemelham aos descritos por Tafuri e colaboradores, que observaram a presença de granulomas no fígado de todos os cães naturalmente infectados estudados, independente das manifestações clínicas (TAFURI, 1996).

Além dos sinais clínicos, as alterações hematológicas e bioquímicas também foram avaliadas, revelando uma associação entre alterações histológicas de caráter inflamatório e alterações laboratoriais. Estudo anterior relatou a correlação positiva entre a progressão de hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer e o aumento nos níveis de globulina sérica e proteínas totais, além de uma correlação negativa com as concentrações de albumina sérica (GIUNCHETTI, 2008). Em relação às demais alterações bioquímicas e hematológicas, tem sido descrita na literatura a relação entre tais alterações e um quadro clínico mais grave e cães com LV. Contudo, essas alterações não foram avaliadas em relação às alterações histológicas no fígado, mas em relação à manifestação clínica, carga parasitária e desorganização da polpa branca esplênica, o que difere dos critérios avaliados no presente estudo (REIS, 2006a, LIMA, 2014).

Ao associar a presença de infecção ativa à organização da polpa branca esplênica, os animais com infecção ativa e baço moderadamente desorganizado apresentam mais inflamação portal e granulomas intrassinusoidais, além de maior escore histológico global. Além disso, cães com infecção ativa e baço desorganizado apresentam maior chance de ter hipertrofia de células de Kupffer. Em trabalho realizado anteriormente pelo nosso grupo, mostramos que animais com baço desorganizado apresentavam maior número de sinais clínicos associados à LVC, mostrando uma associação entre a desorganização da polpa branca esplênica e doença mais grave (LIMA, 2014).

Em relação à carga parasitária, o que se observa é que quanto maior a intensidade de inflamação portal, inflamação perivascular central, granulomas portais e intrassinusoidais, maior a carga parasitária no baço. Embora a associação entre as alterações histológicas no fígado e a carga parasitária sejam importantes para a

compreensão da patologia da LVC, os estudos avaliando especificamente essa associação ainda são escassos. Nossos achados indicam uma relação entre a intensidade de alterações histológicas inflamatórias e a carga parasitária no baço do animal. Estudos anteriores relatam a relação entre a presença de granulomas e parasitismo no fígado. Isso reforça a hipótese de que a presença do parasita induz resposta inflamatória no parênquima hepático (GIUNCHETTI, 2008; BINHAZIM, 1993; GUTIERREZ, 1984). Porém, em nosso estudo, observou-se que quanto menor a intensidade de linfocitose intrassinusoidal, de agregados intrassinusoidais e hipertrofia de células de Kupffer, maior a carga parasitária no baço. Tais achados parecem indicar uma relação entre tais alterações e o controle da infecção.

Nesse sentido, nossos achados diferem do que é observado em modelos experimentais, onde o granuloma é apontado como marcador de resistência. Nossos dados sugerem que, em cães, é possível que exista um perfil de resposta diferente do descrito em modelos murinos. Nesse caso, a ativação de células de Kupffer e o aumento de linfócitos no fígado, observados nos sinusóides e que podem se unir formando pequenos agregados, seriam os responsáveis pela contenção da infecção, com eliminação de parasitos. Assim, com a redução da carga parasitária e controle da infecção, não haveria a formação de granulomas e contenção da infecção.

Uma alteração de destaque nos nossos achados é a hipertrofia de células de Kupffer. A ocorrência desta alteração tem sido muito descrita na literatura, e a sua intensidade parece ser influenciada pela intensidade de parasitismo, como uma possível forma de controlar a infecção (GIUNCHETTI, 2008; SANCHÉZ, 2004; TAFURI, 1996; TAFURI, 2001, EL HAG, 1994). Em nosso estudo, observamos uma associação entre a hipertrofia de células de Kupffer e menor carga parasitária no baço. Segundo McGavin (2012), o fluxo de sangue nos sinusóides é lento e favorece contato do sangue com os hepatócitos, e também favorece o contato de patógenos com as células de Kupffer, facilitando sua remoção por fagocitose. Estudos em cães com LV também descrevem a reatividade destes macrófagos hepáticos (LIMA, 2007; GIUNCHETTI, 2008; REIS, 2009). Possivelmente, as células de Kupffer participam da modulação da resposta hepática ao parasito, na secreção de citocinas e óxido nítrico, que induziriam a resposta imune e controle da infecção. As mesmas células possivelmente iniciam a formação dos granulomas na LVC. Em nosso estudo, além da hipertrofia de células de Kupffer, a linfocitose intrassinusoidal e a formação de

agregados também estão relacionadas com menor carga parasitária. Isso pode indicar uma cooperação entre os linfócitos e as células de Kupffer, com a ativação das células de Kupffer para a destruição do parasito.

No presente estudo, os granulomas observados nos sinusóides eram compostos por macrófagos, por vezes parasitados, linfócitos e, em alguns casos, plasmócitos, com variação no tamanho e no grau de organização, havendo desde agrupamentos pouco organizados de células até granulomas maduros, circunscritos e bem organizados. Mariano (1995) afirma que os macrófagos são os principais componentes da inflamação granulomatosa, pois se diferenciam em células epitelíoides e em células gigantes, mas a presença de linfócitos neste tipo de inflamação pode contribuir para a expansão ou para a resolução da lesão. Ainda, Murphy e colaboradores (2008) destacam que nos granulomas do tipo lepromatoso, a presença de linfócitos T está reduzida ou ausente. As observações destes autores podem ser aplicadas para o nosso estudo e, as diferenças no perfil celular dos granulomas poderiam ser associadas a um possível perfil alterado de citocinas no microambiente hepático.

Sanchez e colaboradores (2004) observaram uma resposta inflamatória distinta entre cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados com *L. chagasi*. Em seu estudo, é descrito que o fígado de animais assintomáticos apresentou uma resposta imune inflamatória efetiva, com formação de granulomas bem organizados. Nos cães sintomáticos ocorreu à formação de granulomas desorganizados compostos preferencialmente por células de Kupffer altamente parasitadas (SANCHÉZ, 2004). Em nosso estudo, não foi observada tal associação entre a presença e as características dos granulomas e a apresentação clínica dos animais. Observamos a ocorrência de granulomas bem organizados contendo parasitas em seu interior, o que difere da resposta efetiva descrita por Sánchez. É possível que estes granulomas representem uma etapa na resposta, na qual ainda não houve a completa eliminação do parasita. Para responder a tal questão, seria necessária a realização de um estudo de cinética, no qual fosse avaliada a resposta do fígado dos cães ao longo do tempo. Outro aspecto a ser lembrado é que diferenças no desenho experimental podem explicar algumas diferenças observadas entre o descrito por Sánchez e os dados aqui mostrados. No trabalho de Sánchez não é detalhada a origem dos animais, se estes eram animais domiciliados ou em situação de rua. Parece se tratar de uma amostra

de conveniência, o que poderia explicar o grande número de animais assintomáticos. Nossa amostra, obtida em inquérito do controle de controle de zoonoses, é composta por animais abandonados e semi domiciliados, com acesso livre às ruas. As condições de vida dos animais podem interferir na evolução da doença, como a qualidade da alimentação, a utilização de terapias prévias e de controle de sinais, maior exposição a patógenos.

Em relação às características observadas nos granulomas, nossos dados apontam que animais com granulomas médios apresentam maior proporção de células MAC387 e menor proporção de células CD3. Isso indica que granulomas maiores são compostos, em sua maioria, por macrófagos, com uma menor proporção de células T.

Na infecção experimental com *L. donovani* em camundongos, foi observado que a capacidade do fígado em resolver a infecção é dependente da formação de focos inflamatórios em torno das células de Kupffer infectadas, constituídos por linfócitos e monócitos, os quais permitem a fusão de células infectadas e a destruição de amastigotas por macrófagos ativados no infiltrado (ENGWERDA e KAYE, 2000). Alguns autores afirmam que, no fígado, a presença de granulomas associados à baixa carga parasitária seria um marcador de resistência deste órgão à infecção (GIUNCHETTI, 2008). Embora a principal célula na formação do granuloma seja o macrófago (célula de Kupffer), os linfócitos são fundamentais para a formação e manutenção da estrutura do granuloma. Em modelos experimentais, observou-se que células T são necessárias para a resolução da infecção por *L. donovani* no fígado, e são recrutadas durante o desenvolvimento de granuloma em resposta a vários estímulos, como a produção de quimiocinas e citocinas após o recrutamento de monócitos e neutrófilos. O número de células T no fígado aumenta durante 7 dias após a infecção, provavelmente refletindo a expansão local e o recrutamento a partir do baço. As células T atuam na manutenção do granuloma através da produção de citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  (perfil Th1) (STANLEY & ENGWERDA, 2007). Não foi possível, com os dados obtidos no presente trabalho, diferenciar os granulomas de acordo com a permissividade dos mesmos ao parasita, uma vez que todos continham parasitas, mesmo que em quantidades variáveis. Contudo, na etapa anterior do nosso trabalho, foi observada a formação de granulomas em cães sem infecção ativa e sem manifestação clínica de doença. Seria interessante realizar o estudo dos granulomas

desses animais, a fim de identificar possíveis características relacionadas à permissividade de granulomas ao parasito.

Em relação à produção de citocinas nos granulomas, nossos dados mostram que animais com granulomas médios apresentam maior produção de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , e que a produção de tais citocinas apresenta também uma correlação positiva com a quantidade de parasitas nos granulomas. A coexpressão de tais citocinas poderia indicar uma fase transitória no processo de formação desses granulomas, na qual ocorre a produção de citocinas de ambos os perfis (Th1 e Th2), até que haja a estabilização do granuloma, com predomínio de uma das respostas. Para a melhor compreensão desse quadro, seriam necessários estudos avaliando a cinética da formação do granuloma no fígado de cães com leishmaniose visceral, mostrando quando se inicia o processo de formação desses granulomas, e qual o perfil de citocinas expressas nesses granulomas ao longo do seu processo de maturação.

Em nosso estudo, mostramos que animais com mais granulomas apresentam maior produção de IgA, IgE, IgG total, IgG 1 e IgG 2. Embora existam na literatura estudos sobre a resposta humoral na LVC, não foi descrita até o momento a associação entre o perfil de granulomas hepáticos e a produção de imunoglobulinas. Reis e colaboradores (2006b) observaram uma forte correlação entre IgG1 e doença assintomática, mas com IgA, IgE e IgG2 apresentando maior associação com doença sintomática (REIS, 2006b).

A ativação policlonal de células B na leishmaniose experimental e humana tem sido descrita na literatura, além da associação entre essa ativação, a hiperglobulinemia e ocorrência de imunocomplexos circulantes, autoimunidade e progressão da doença (BUNN-MORENO, 1985; GALVAO-CASTRO, 1984; SMELT, 2000). No presente estudo, cães com mais granulomas apresentavam maior produção de anticorpos. A relação entre ativação policlonal de células B, com produção elevada de anticorpos e gravidade da doença pode sugerir uma ligação entre a quantidade de granulomas no fígado de cães com leishmaniose visceral e a gravidade de doença. A isso soma-se o fato de que na etapa inicial do nosso trabalho, foi observada uma associação entre a maior frequência de granulomas e maior carga parasitária no baço dos cães estudados.

A compreensão da resposta imune em cães com LV é complexa, pois além dos fatores genéticos e da variabilidade individual de cada animal, existe um total

desequilíbrio entre fatores promotores e reguladores do processo inflamatório. Outro aspecto que deve ser ressaltado é a influência do tempo de infecção na resposta imune dos cães, pois neste estudo utilizaram-se animais com infecção natural e não foi possível determinar o tempo exato de evolução da doença. Além disso, a maioria dos cães incluídos nesse estudo eram abandonados ou considerados semi domiciliados, sendo animais com alimentação irregular, controle de coinfeções ineficaz ou inexistente, exposição a intempéries, entre outros fatores que podem influenciar na apresentação clínica da doença, bem como no estado do sistema imunológico do animal.

Os dados aqui apresentados sugerem que a resposta no fígado de cães com leishmaniose visceral pode seguir em três direções diferentes (figura 19): 1) ocorre a cooperação entre linfócitos T e células de Kupffer, com a ativação das células de Kupffer e consequente destruição do parasito e controle da infecção. Essa cooperação é refletida histologicamente na presença de hipertrofia de células de Kupffer, linfocitose intrassinusoidal e formação de agregados intrassinusoidais, e tem como repercussão a redução na carga parasitária; 2) ocorre a ativação das células de Kupffer e atividade de linfócitos T, contudo essa resposta não é eficaz ao ponto de controlar completamente a infecção, o que acaba por levar à formação de granulomas não permissivos, no interior dos quais o parasito é aprisionado e destruído; 3) ocorre a infecção, porém não há ativação adequada das células de Kupffer, que permanecem parasitadas e podem se unir formando granulomas desorganizados e permissivos ao parasito. Para esclarecer quais os mecanismos exatos nos diferentes padrões de resposta, seria necessário um estudo que aborde a evolução da infecção no fígado, detalhando a cinética da formação de granulomas.

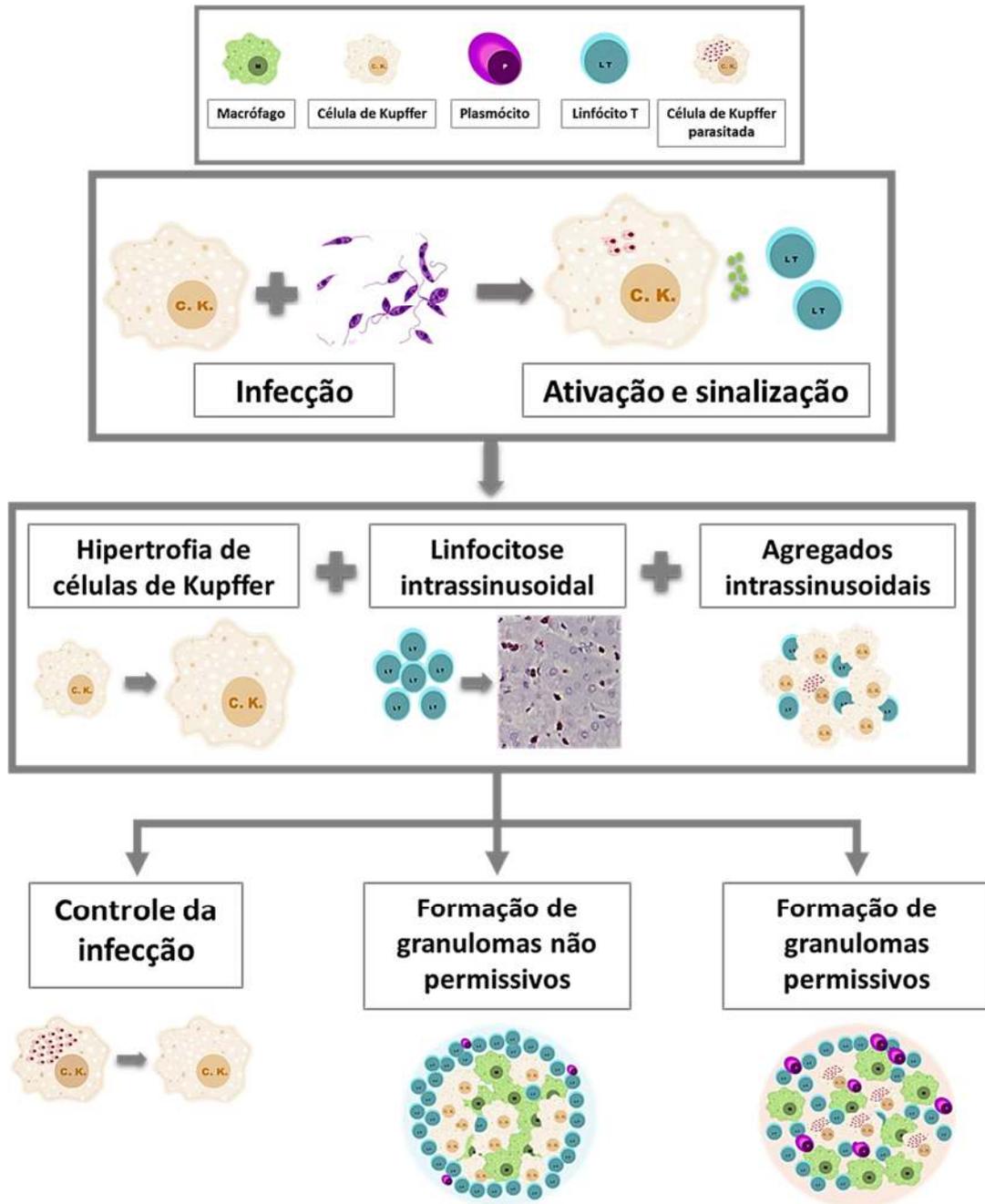


Figura 19: Perfis de resposta no fígado de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1- Cães com infecção ativa apresentam mais alterações histológicas inflamatórias no fígado, quando comparados com cães sem infecção ativa. A presença de sinais clínicos e a desorganização da polpa branca esplênica estão associadas a um agravamento de tais alterações histológicas. Estas alterações histológicas observadas no fígado estão associadas com alterações no hemograma e em parâmetros bioquímicos, indicando uma relação com a gravidade da doença.
- 2- A carga parasitária no baço está associada com maior intensidade de inflamação no fígado, com formação de granulomas. Contudo, o inverso é observado com relação a linfocitose intrassinusoidal, com formação de agregados, e hipertrofia de células de Kupffer, o que pode indicar uma relação entre tais alterações e uma resposta de controle do parasito.
- 3- O tamanho dos granulomas no fígado está associado com o fenótipo das células que o compõem, bem como com a expressão de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . A quantidade de parasitos dentro dos granulomas também está relacionada com a expressão de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ : quanto maior o granuloma e mais parasitado, maior a expressão de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ .
- 4- A frequência de granulomas no fígado está associada com uma maior produção de imunoglobulinas. Tais dados indicam que a falha no controle da carga parasitária está associada a um padrão de resposta humoral, refletindo uma dificuldade no controle da doença.

## REFERÊNCIAS

- ABINPET. **Dados de mercado**. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado>>. Acesso em: 15 ago 2017.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVES, C. F. et al. 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**, v. 128, n. 4, p. 349-358, 2009.
- ANDRADE, Z. A. Patologia da Leishmaniose Visceral. **Arquivos Brasileiro de Medicina Naval**, v.19 p. 79-204, 1958.
- ASHFORD, D. A. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.
- BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, 2000.
- BALEEIRO, C. O. et al. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 21-28, 2006.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.
- BARROUIN-MELO, S. M. et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 195-197, 2004.
- BARROUIN-MELO, S. M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BELLI, A. et al. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 102-109, 1998.

BINHAZIM, A. A. et al. Canine leishmaniasis caused by *Leishmania leishmania infantum* in two Labrador retrievers. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. 3, p. 299-305, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **II Fórum de discussão sobre o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii\\_forum\\_tratamento\\_relatorio\\_final\\_07\\_10\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final_07_10_2009.pdf). 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Glossário Leishmaniose**. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-lv>. 2017.

BUNN-MORENO, M. M. et al. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 59, n. 2, p. 427, 1985.

CARDOSO, L. et al. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, n. 1, p. 35-41, 2007.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.

CORRÊA, A. P. F. L. et al. Evaluation of transformation growth factor  $\beta$  1, interleukin-10, and interferon- $\gamma$  in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3, p. 267-274, 2007.

DANESHVAR, H. et al. Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum*: cellular immunity production and protection of dogs against experimental canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 11-12, p. 722-730, 2010.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. S1, 2009.

DE ABREU, R. T. et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. e18873, 2011.

DE QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1, p. 1-8, 2011.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1455, n. 2, p. 341-352, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DINIZ, S. A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 01, p. 024-033, 2008.

DOS-SANTOS, W. L. C. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3, p. 251-259, 2008.

DUARTE, M. I. S.; CORBETT, C. E. P. Histopathological patterns of the liver involvement in visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n. 3, p. 131-136, 1987.

DUARTE, M. I. S. et al. Human visceral leishmaniasis expresses Th1 pattern in situ liver lesions. **Journal of Infection**, v. 57, n. 4, p. 332-337, 2008.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G.; SACK, W. O. **Tratado de anatomia veterinária**. Elsevier Brasil, 2004.

EL HAG, I. A. et al. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 6, p. 547-551, 1994.

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 11, n. 10, p. 623-628, 2009.

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

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, p. 524-530, 2004.

EROSCHENKO, V. P.; DI FIORE, M. S.H. **DiFiore's atlas of histology with functional correlations**. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária – moléstias do cão e do gato**. 4 ed. Manole: São Paulo, 1997. v.2, p. 565- 567.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 161-173, 2003.

FRAGA, D. B. M et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting Leishmania infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3, p. 591-594, 2012.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3, p. 214-221, 2006.

FUJIWARA, S. et al. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from dogs experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 93, n. 1, p. 9-20, 2003.

GALVAO-CASTRO, B. et al. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 56, n. 1, p. 58, 1984.

GAUTAM, S. et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1134-1137, 2011.

GENARO, O. et al. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with Leishmania (Viannia) braziliensis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p. 163-164, 1992.

GHALIB, H. W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human Leishmania donovani infections. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 1, p. 324, 1993.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 269-277, 2008.

- GÓMEZ-OCHOA, P. et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 259-263, 2009.
- GOMES-PEREIRA, S. et al. Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF- $\beta$  production. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 59-68, 2004.
- GONZALEZ, J. L. et al. Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. **Histology and Histopathology**, v. 3, p. 323-329, 1988.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003.
- GUERRA, L. L. et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 104, n. 3, p. 611, 2009.
- GUTIERREZ, Y.; MAKSEM, J. A.; REINER, N. E. Pathologic changes in murine leishmaniasis (*Leishmania donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. **The American Journal of Pathology**, v. 114, n. 2, p. 222, 1984.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiología Médica**. 11 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2006. p. 179 – 180.
- HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, p. 1191–1199, 1999.
- JUNQUEIRA, L. C. et al. **Histología Básica**. 12. ed. Guanabara Koogan, 2013.
- KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 239-253, 2004.
- KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376-383, 1999.
- KUHLS, K. et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3, p. 296-300, 2013.

LECLERCQ, V. et al. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 10, p. 4537-4545, 1996.

LIMA, W. G. et al. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, n. 1, p. 129-136, 2007.

LIMA, L. V. R. et al. Canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 5, p. 259-266, 2010.

LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e87742, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2011.

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

MARTINEZ-SUBIELA, S. et al. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Record**, v. 150, n. 8, p. 241-244, 2002.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1145-1149, 1995.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MCEL RATH, M. J.; MURRAY, H. W.; COHN, Z. A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 6, p. 1927-1937, 1988.

MCGAVIN M.D.; ZACHARY J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 5 ed. Mosby Elsevier, St Louis, Missouri, 2012. p. 405 – 453.

MELO, F. et al. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 2, p. 198-204, 2008.

MELO, F. A. et al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 5, p. 538-548, 2009.

MELO, G. D. et al. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: a natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1, p. 57-66, 2013.

MENDONÇA, L. et al. Clinics aspects of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs in the city of Teresina, Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, p. 23-25, 1999.

MICHELIN, A.; PERRI, Silvia Helena Venturoli; DE LIMA, V. M. F. Evaluation of TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L.(L.) chagasi* naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 105, n. 5, p. 373-383, 2011.

MORENO, A. et al. Hepatic fibrin-ring granulomas in visceral leishmaniasis. **Gastroenterology**, v. 95, n. 4, p. 1123-1126, 1988.

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

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

MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and-independent leishmanicidal activity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, n. 1, p. 32, 1983.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 4, p. 741-746, 1999.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 5, p. 249-267, 2001.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

- OLIVEIRA, G. G. S.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M.. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p. 243-248, 1993.
- PAMPIGLIONE, S.; LA PLACA, M.; SCHLICK, G. Studies on mediterranean leishmaniasis I. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 5, p. 349-359, 1974a.
- PAMPIGLIONE, S. et al. Studies on Mediterranean leishmaniasis 2. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 6, p. 447-453, 1974b.
- PANGRAZIO, K. K. et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3, p. 327-331, 2009.
- PARANHOS-SILVA, M. et al. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 97-111, 2003.
- PENHA, T.A. **Expressão das quimiocinas MIP-1 $\alpha$**  e MCP-1 em relação à carga parasitária em cães com Leishmaniose Visceral. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.
- PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.
- QUEIROZ, M. JA; ALVES, J. GB; CORREIA, J. B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.
- RALLIS, T. et al. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, n. 2, p. 145-152, 2005.
- REALE, S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.
- REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006a.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3, p. 102-116, 2006b.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1, p. 87-95, 2009.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, n. 3, p. 190-198, 2007.

ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463, 2004.

RUBIN, R. et al. (Ed.). **Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine**. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

SANCHEZ, M. A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 6, p. 618-624, 2004.

SANCHEZ-ROBERT, E. et al. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, n. 1, p. 168-175, 2008.

SANT ANA, J. A. P. et al. Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1137-1144, 2007.

SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515-524, 2008.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 471-489, 2009.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, J. S. et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PloS One**, v. 7, n. 1, p. e29103, 2012.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SMELT, S. C. et al. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 8, p. 3813-3821, 1997.

SMELT, S. C. et al. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3681-3688, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1-18, 2009.

SOLCÀ, M. S. et al. Circulating Biomarkers of Immune Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 32619, 2016.

SQUIRES, K. E. et al. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 12, p. 4244-4249, 1989.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 138, 2007.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAFURI, W. L. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 2, p. 81-89, 1996.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1, p. 17-23, 2004.

TIWANANTHAGORN, S. et al. Involvement of CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in persistence of *Leishmania donovani* in the liver of alymphoplastic aly/aly mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1798, 2012.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 109, n. 4, p. 1051-1057, 2011.

UZAIR, M. et al. Visceral Leishmaniasis (Kala Azar); Presentation, Diagnosis and Response to Therapy (An Experience of Ten Cases in Adults). **Gomal Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 1, 2004.

VALLADARES, J. E. et al. Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Records**, v. 141, n. 22, p. 574-575, 1997.

WHO. 2017a. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

WHO. 2017b. WHO informe leishmanioses, 2017.

WILSON, M. E. et al. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 6, p. 2231-2239, 1996.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147-160, 2005.

YOUNG, B. O'DOWD, Geraldine; WOODFORD, Phillip. **Wheater's functional histology: a text and colour atlas**. 6. ed. Elsevier, 2014.