

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Francini Neves Ribeiro

Aspectos histopatológicos comparativos da pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador (es): Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida
Prof. Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado

Rio de Janeiro
2021

Neves Ribeiro, Francini .

Aspectos histopatológicos comparativos da pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. / Francini Neves Ribeiro. - Rio de Janeiro, 2021.

xvi, 92f. f.; il.

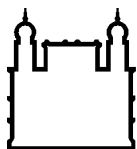
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Renato Porrozzi de Almeida.

Orientadora: Fernanda Nazaré Morgado.

Bibliografia: f. 83-89

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. *Leishmania infantum*. 3. Pele. 4. Disseminação parasitária. 5. Vascularização da pele. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Francini Neves Ribeiro

Aspectos histopatológicos comparativos da pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

Orientador (es): Prof. Dr. Renato Porrozzi de Almeida
Prof^a. Dr^a. Fernanda Nazaré Morgado

Aprovada em: 01/12/2021

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro – IOC/FIOCRUZ (Presidente)
Prof^a. Dr^a. Paula Mello de Luca – IOC/FIOCRUZ (Membro titular)
Prof^a. Dr^a. Adriana Pittella Sudré – UFF/RJ (Membro titular)
Prof^a. Dr^a. Tânia Zaverucha do Valle – IOC/FIOCRUZ (Suplente)
Prof. Dr. Fábio Alves – UFF/RJ (Suplente)

Rio de Janeiro, 01 de dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de realizar esse trabalho e poder contribuir de alguma forma para o entendimento de uma doença que atinge e faz sofrer muitos cães em nosso país. Agradeço também pela oportunidade de concluí-lo mesmo em uma situação mundialmente delicada devido a pandemia de COVID-19.

Agradeço à espiritualidade que esteve sempre presente me auxiliando nos momentos difíceis.

À minha família pelo amor incondicional e por todo apoio durante essa jornada. Vocês foram essenciais para que isso fosse possível.

Ao Paulo por todo apoio e paciência mesmo com toda a distância. Obrigada por me fazer enxergar o quanto eu sou capaz.

Aos meus orientadores Renato e Fernanda por acreditar e confiar em mim para o desenvolvimento desse trabalho. Tenho muita admiração e respeito por vocês. Obrigada!!

À Thais Okamoto por ser a peça-chave do início da minha carreira. Minha eterna gratidão por tudo.

Aos meus companheiros de experimentos que se tornaram amigos, Áurea Virgínia, Tainã e Leonardo, vocês moram no meu coração.

Às minhas amigas Leda e Mayara por todos os momentos felizes que tornaram essa jornada mais fácil. Quando achei que estava sozinha, encontrei duas irmãs de alma que me mostraram que é possível ter uma segunda família.

À Mayla por todo apoio e pela amizade inesperada que levo no meu coração.

Aos nossos colaboradores do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas que me auxiliaram nesse trabalho.

Aos membros do laboratório que fizeram parte desse trabalho de forma direta ou indireta

À minha psicóloga por me ajudar a manter o psicológico estável em uma pandemia.

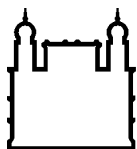
Às agências de fomento pelo auxílio financeiro.

E por último e não menos importante, aos cães que fizeram parte desse trabalho, os quais tenho muito respeito.

Minha eterna gratidão à todos vocês!!!

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

Coríntios 13:1,2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

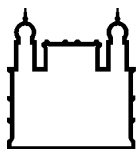
Aspectos histopatológicos comparativos da pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO/

Francini Neves Ribeiro

A leishmaniose visceral (LV) representa um importante problema de saúde pública. O cão é considerado o principal reservatório doméstico, pois mesmo quando assintomático pode apresentar carga detectável de *Leishmania* na pele sadia possuindo capacidade de infectar o vetor. As lesões de pele em cães acometidos por LV têm sido frequentemente observadas, e a pele da orelha tem mostrado uma maior intensidade de alterações inflamatórias, além de uma maior carga parasitária em relação a outros locais analisados. No entanto, as alterações vasculares na derme e possível correlação com o aumento da carga parasitária e disseminação do parasito pela pele ainda não estão completamente estabelecidas. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações inflamatórias e vasculares em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e sua correlação com a carga parasitaria e a sintomatologia clínica. Vinte e seis cães positivos no teste DPP®CVL e ELISA foram incluídos nesse estudo. Após avaliação clínica, os animais foram divididos em grupos: 1- assintomáticos; 2- sintomáticos. Observamos que os sinais clínicos dermatológicos são observados com maior frequência em relação a outros sinais clínicos, sendo a dermatite o sinal clínico dermatológico mais observado. Os fragmentos de pele de orelha mostraram carga parasitária elevada independente da progressão da doença e distribuída de forma mais difusa. Foi observado também maior intensidade de infiltrado inflamatório em relação a pele de abdômen, além de maior reação granulomatosa. A menor quantidade de colágeno foi observada em pele de orelha e se associou com o maior número e distribuição da carga parasitária pelo tecido. Ao analisar as alterações vasculares, em ambos os grupos, a pele da orelha apresentou vasos sanguíneos com maior diâmetro e maior número em relação àqueles da pele de abdômen. Foi possível observar correlação positiva entre o número de amastigotas e o número de vasos presentes na derme, assim como associação entre a presença de amastigotas e intensidade do infiltrado inflamatório. Em conjunto, os dados sugerem uma relação entre as alterações vasculares e a disseminação do parasito pela pele de cães possivelmente impactando no seu papel como reservatório da LV. Além disso, indicam que a pele da orelha se mostrou um sítio interessante para a coleta de amostras clínicas para diagnóstico devido a maior probabilidade de detecção de amastigotas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Comparative histopathological aspects of ear and abdominal skin of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO/

Francini Neves Ribeiro

Visceral leishmaniasis (VL) represents a very important public health problem. The dog is considered the main domestic reservoir, because even when asymptomatic it can have a detectable *Leishmania* load in the healthy skin, being able to infect the vector. Skin lesions in dogs affected by VL have been frequently observed, and the skin of the ear has shown a higher intensity of inflammatory changes, in addition to a higher parasite load in relation to other sites analyzed. However, the vascular changes in the dermis and possible correlation with increased parasite load and parasite spread through the skin are not yet fully established. The aim of this study was to evaluate inflammatory and vascular changes in the skin of the ear and abdomen of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and their correlation with parasite load and clinical symptoms. Twenty-six dogs positive for DPP®CVL and ELISA were included in this study. After clinical evaluation, the animals were divided into groups: 1- asymptomatic; 2- symptomatic. We observed that dermatological clinical signs are observed more frequently than other clinical signs, with dermatitis being the most observed dermatological clinical sign. Ear skin fragments showed high parasite load independent of disease progression and more diffusely distributed. A greater intensity of inflammatory infiltrate was also observed in relation to the skin of the abdomen, in addition to a greater granulomatous reaction. The lowest amount of collagen was observed in the ear skin and was associated with the highest number and distribution of the parasite load in the tissue. When analyzing the vascular alterations, in both groups, the ear skin presented blood vessels with larger diameter and greater number in relation to those of the abdomen skin. It was possible to observe a positive correlation between the number of amastigotes and the number of vessels present in the dermis, as well as an association between the presence of amastigotes and the intensity of the inflammatory infiltrate. Taken together, the data suggest a relationship between vascular changes and the spread of the parasite through the skin of dogs possibly impacting on their role as a VL reservoir. Furthermore, they indicate that the skin of the ear proved to be an interesting site for collecting clinical samples for diagnosis due to the higher probability of amastigotes detection.

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xv
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvi
1 Introdução	1
1.1.0 O parasito <i>Leishmania</i>	1
1.1.1 Hospedeiros Reservatórios no Contexto da Leishmaniose Visceral	2
1.1.2 Ciclo Biológico.....	3
1.1.3 Distribuição geográfica	4
1.1.4 Vetores no velho e novo mundo	5
1.2.0 Leishmaniose Visceral Canina.....	6
1.2.1 Formas de Transmissão da LVC	7
1.2.2 Apresentação clínica de cães com LVC	8
1.2.3 Lesões de pele em cães com LVC.....	10
1.3.0 A pele.....	11
1.3.1 A estrutura da pele canina	11
1.3.2 Diferenças entre a vascularização cutânea de cães e humanos.....	12
1.4.0 Células imunes da pele.....	13
1.4.1 Queratinócitos	14
1.4.2 Células de Langerhans.....	15
1.4.3 Células Dendríticas.....	16
1.4.4 Macrófagos	16
1.4.5 Neutrófilos	17
1.4.6 Linfócitos.....	19
1.5 Matriz extracelular durante a infecção por <i>Leishmania</i>	21
2 Objetivos	22
2.0 Objetivo Geral	22
2.1 Objetivos específicos.....	22
3 Metodologia	23
3.0 Desenho experimental.....	23
3.1 Aspectos éticos.....	23
3.2 Animais e avaliação clínica	24
3.3 Análise histopatológica.....	25
3.4 Imunohistoquímica.....	25
3.5 Análise estatística	26
4 Resultados	27
4.1 Onicogribose e dermatite foram os sinais clínicos observados com maior intensidade e maior frequência em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	27

4.2	Cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> , apresentam maior intensidade de infiltrado inflamatório em pele de orelha	29
4.3	Animais sintomáticos apresentam infiltrado inflamatório acometendo regiões mais extensas na derme	33
4.4	Animais sintomáticos apresentam maior frequência de reação granulomatosa ..	37
4.5	A presença de reação granulomatosa está associada à intensidade do infiltrado inflamatório	39
4.6	A presença de reação granulomatosa está associada à distribuição do infiltrado inflamatório	41
4.7	Número de amastigotas se mantem elevado em pele de orelha independente da progressão da doença.....	42
4.8	A distribuição de amastigotas está associada à intensidade do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen	45
4.9	A distribuição de amastigotas está associada à distribuição do infiltrado inflamatório em pele de orelha	48
4.10	Pele de orelha de animais sintomáticos possui maior diâmetro vascular em comparação com a pele de abdômen.....	50
4.11	O diâmetro vascular está associado à intensidade do infiltrado inflamatório....	52
4.12	Diâmetro vascular está associado à presença de infiltrado inflamatório	53
4.13	Não houve correlação entre o número de amastigotas presentes na derme e o diâmetro vascular.....	54
4.14	Não houve associação entre o diâmetro vascular e a distribuição de amastigotas	55
4.15	Pele de orelha possui maior número de vasos sanguíneos em comparação com a pele de abdômen.....	56
4.16	Número de vasos sanguíneos está associado à intensidade do infiltrado inflamatório	57
4.17	Número de vasos sanguíneos está correlacionado com a carga parasitária.....	59
4.18	Número de vasos sanguíneos dérmicos está associado à presença de amastigotas	61
4.19	Pele de orelha de cães com sintomatologia clínica apresentam menor quantidade de colágeno dérmico.....	62
4.20	Quantidade de colágeno presente na derme está associada à intensidade do infiltrado inflamatório	64
4.21	A diminuição na quantidade de colágeno dérmico está associada à distribuição do infiltrado inflamatório	67
4.22	A menor quantidade de colágeno dérmico está associada à maior carga parasitária	69
4.23	A menor quantidade de colágeno dérmico está associada à distribuição de amastigotas	70
5	Discussão	73
6	Conclusões	81
7	Referências	83
8	Anexos	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.0- Formas evolutivas da <i>Leishmania</i>	2
Figura 1.1- Ciclo de vida da <i>Leishmania infantum</i>	4
Figura 1.2- Status da endemicidade da leishmaniose visceral no mundo.....	5
Figura 1.3- Ciclo de vida da <i>L. infantum</i>	8
Figura 1.4- Manifestações clínicas e características imunológicas da infecção por <i>L. infantum</i> em cães.....	9
Figura 1.5- Vascularização cutânea em cães, gatos e humanos.....	13
Figura 1.6- Componentes celulares do sistema imune cutâneo.....	14
Figura 1.7- Papel das células de Langerhans durante a infecção por <i>Leishmania</i>	15
Figura 1.8- Resistência ou Suscetibilidade de acordo com a polarização de linfócitos T.....	20
Figura 3.0- Desenho experimental. Demonstração da organização dos experimentos	23
Figura 4.0- Intensidade de sinais clínicos apresentados por 13 cães sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	27
Figura 4.1 - Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de fragmentos de pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Amastigotas parasitando macrófago. Figura B: Pele de abdômen de cão assintomático com ausência de infiltrado inflamatório. Figura C: Pele de orelha do mesmo cão da figura B apresentando infiltrado inflamatório moderado. Figura D: Pele de abdômen de cão sintomático apresentando infiltrado inflamatório moderado. Figura E: Pele de orelha do mesmo cão da figura D apresentando infiltrado inflamatório intenso.....	30
Figura 4.2 - Frequência de fragmentos de orelha e abdômen analisados de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	31
Figura 4.3 - Frequência de animais de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen. Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos.....	31
Figura 4.4 - Frequência de animais de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório e sintomatologia clínica. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen.....	31
Figura 4.5 - Fotomicrografias de pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> apresentando ausência e distribuição do infiltrado inflamatório: Figura A: Infiltrado ausente. Figura B: Infiltrado prerivascular. Figura C: Infiltrado leve e difuso. Figura D: Infiltrado moderado e difuso. Figura E: Infiltrado intenso e difuso.....	34
Figura 4.6 - Frequência de fragmentos de orelha e abdômen analisados de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório em cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	35
Figura 4.7 - Frequência de animais de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen. Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos.....	36

Figura 4.8 - Frequência de animais de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório e sintomatologia clínica. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen.....	37
Figura 4.9 - Fotomicrografia da pele de orelha de cão sintomático apresentando infiltrado inflamatório intenso e difuso com a presença de reação granulomatosa.....	38
Figura 4.10 - Frequência de fragmentos de orelha e abdômen analisados de acordo com a presença de reação granulomatosa em cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por <i>L.infantum</i>	38
Figura 4.11 - Frequência de animais de acordo com a presença de regiões granulomatosas e sintomatologia clínica. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen.....	39
Figura 4.12 - Associação entre a presença de reação granulomatosa em cães naturalmente infectados por <i>L.infantum</i> de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório.....	40
Figura 4.13 - Associação entre a presença de reação granulomatosa em cães naturalmente infectados por <i>L.infantum</i> de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. A: Pele de orelha B: Pele de abdômen.....	40
Figura 4.14 Associação entre a presença de reação granulomatosa em cães naturalmente infectados por <i>L.infantum</i> de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório.....	41
Figura 4.15 - Associação entre a presença de reação granulomatosa em cães naturalmente infectados por <i>L.infantum</i> de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen.....	42
Figura 4.16 - Amastigotas por campo em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	43
Figura 4.17 -Amastigotas por campo em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . A:Cães assintomáticos. B:Cães sintomáticos.....	44
Figura 4.18 -Amastigotas por campo em fragmentos de pele de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen.....	44
Figura 4.19 - Fotomicrografia de amastigotas marcadas por imuno-histoquímica (vermelho-DAB). Figura A: Amastigotas parasitando o citoplasma de células endoteliais. Figura B-E: Amastigotas localizadas em regiões perivasculares. Figura F e G: Amastigotas observadas dentro do vaso. Figuras H e I: Amastigotas difusas.....	46
Figura 4.20 - Fotomicrografia de amastigotas e antígenos de amastigotas marcadas por imuno-histoquímica (vermelho-DAB). A, B e C: Amastigotas localizadas em regiões perivasculares na pele de abdômen do mesmo cão assintomático.....	46
Figura 4.21 - Associação entre a distribuição de amastigotas e a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Fisher's exact test.....	47
Figura 4.22 - Associação entre a distribuição de amastigotas e a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen. Fisher's exact test.....	48
Figura 4.23 - Associação entre a distribuição de amastigotas e a distribuição do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	49

Figura 4.24 - Associação entre a distribuição de amastigotas e a distribuição do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen. Fisher's exact test.....	50
Figura 4.25 - Fotomicrografia da pele de orelha e abdômen de cão assintomático naturalmente infectado por <i>L. infantum</i> . A: Pele do abdômen com vasos dérmicos sem dilatação. B: Pele da orelha com vasos dérmicos com dilatação.....	51
Figura 4.26 - Comparação entre o diâmetro vascular em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Willcoxon.test.....	51
Figura 4.27 - Comparação entre o diâmetro vascular em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos. Willcoxon test.....	51
Figura 4.28 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Mann-Whitney test.....	52
Figura 4.29 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos. Mann-Whitney test.....	52
Figura 4.30 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen. Mann-Whitney test.....	53
Figura 4.31 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a presença ou ausência do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> . Mann-Whitney test.....	53
Figura 4.32 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a presença ou ausência do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> . Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães Sintomáticos. Mann-Whitney test.....	54
Figura 4.33 - Correlação entre o diâmetro vascular e o número de amastigotas de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Total. Figura B: Cães assintomáticos. Figura C: Cães Sintomáticos. Figura D: Pele de orelha. Figura E: Pele de abdômen.....	55
Figura 4.34 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a distribuição de amastigotas em pele de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> . Mann-Whitney test.....	56
Figura 4.35 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a presença ou ausência de amastigotas em pele de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> . Mann-Whitney test.....	56
Figura 4.36 - Comparação entre o número de vasos sanguíneos em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Willcoxon test.....	57
Figura 4.37 - Comparação entre o número de vasos sanguíneos em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos. Willcoxon test.....	57
Figura 4.38 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> . Mann-Whitney test.....	58

Figura 4.39 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos. Mann-Whitney test.....	58
Figura 4.40 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> . Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen. Mann-Whitney test.....	58
Figura 4.41 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Mann-Whitney test.....	59
Figura 4.42 - Correlação entre o número de vasos e o número de amastigotas de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Figura A: Total. Figura B: Cães Assintomáticos. Figura C: Cães Sintomáticos. Figura D: Pele de orelha. Figura E: Pele de abdômen. Correlação de Spearman.....	60
Figura 4.43 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a distribuição de amastigotas em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Mann-Whitney test.....	61
Figura 4.44 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a presença de amastigotas em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Mann-Whitney test.....	61
Figura 4.45 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a presença de amastigotas em cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> Figura A: Pele de orelha Figura B: Pele de abdômen. Mann-Whitney test.....	62
Figura 4.46 - Fotomicrografia da pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . A: Pele de abdômen de cão assintomático. B: Pele de orelha do mesmo cão da imagem A. C: Pele de abdômen de cão sintomático. D: Pele de orelha do mesmo cão da imagem C.....	63
Figura 4.47 - Número de amostras de pele de cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a quantidade de colágeno observada. Fisher's exact test.....	63
Figura 4.48 - Número de animais sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a quantidade de colágeno observada A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen. Fisher's exact test.....	64
Figura 4.49 - Quantidade de colágeno em amostras de pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Fisher's exact test.....	65
Figura 4.50 - Quantidade de colágeno em amostras de pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. A: Cães assintomáticos. B: Cães Sintomáticos. Fisher's exact test.....	66
Figura 4.51 - Quantidade de colágeno de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen. Fisher's exact test.....	66
Figura 4.52 - Quantidade de colágeno em amostras de pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Fisher's exact test.....	67
Figura 4.53 - Quantidade de colágeno em amostras de pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. A: Cães assintomáticos. B: Cães sintomáticos. Fisher's exact test.....	68

Figura 4.54 - Quantidade de colágeno em pele cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen. Fisher's exact test.....	68
Figura 4.55 – Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com o número de amastigotas. Mann-Whitney test.....	69
Figura 4.56 - Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com o número de amastigotas. A: Cães assintomáticos. B: Cães sintomáticos. Mann-Whitney test.....	69
Figura 4.57 - Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com o número de amastigotas. A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen. Mann-Whitney test.....	70
Figura 4.58 - Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a distribuição de amastigotas. Fisher's exact test.....	70
Figura 4.59 - Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a distribuição de amastigotas. A: Cães assintomáticos. B Cães sintomáticos. Fisher's exact test.....	71
Figura 4.60 - Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> de acordo com a distribuição de amastigotas. A: Pele de orelha. B Pele de abdômen. Fisher's exact test.....	72
Figura 5.0 - Diferenças observadas em fragmentos de pele de orelha e abdômen de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	80
Figura 6.0 – Esquematização da associação entre as alterações vasculares durante o processo inflamatório e a presença de carga parasitária em pele de orelha.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.0 - Sinais clínicos gerais, dermatológicos e pontuação por escore dos sinais clínicos observados em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> (QUINNELL, 2001 modificado)	28
Tabela 4.1 - Intensidade de infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen de cães assintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	30
Tabela 4.2 - Intensidade de infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen de cães sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	31
Tabela 4.3 - Distribuição do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen de cães assintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	35
Tabela 4.4 - Distribuição do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen de cães sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	35
Tabela 8.0 - Resumo dos resultados observados.....	90

ABREVIATURAS E SIGLAS

- APCs** – Células apresentadoras de antígenos (Antigen presenting cells)
- CCL1** - Ligante de quimiocina (motivo C-C) 1 (C-C Motif Chemokine Ligand 1)
- CCL17** - Ligante de quimiocina (motivo C-C) 17 (C-C Motif Chemokine Ligand 17)
- CCL27** - Ligante de quimiocina (motivo C-C) 27 (C-C Motif Chemokine Ligand 27)
- CCR10** - C-C receptor de quimiocina tipo 10 (C-C Motif Chemokine Receptor 10)
- CCR4** - C-C receptor de quimiocina tipo 4 (C-C Motif Chemokine Receptor 4)
- CCR7** – Receptor de quimiocina tipo 7 (C-C Motif Chemokine Receptor 7)
- CCR8** - C-C receptor de quimiocina tipo 8 (C-C Motif Chemokine Receptor 8)
- CD4** - Grupamento de diferenciação 4 (Cluster of differentiation 4)
- CD8** - Grupamento de diferenciação 8 (Cluster of differentiation 8)
- CLA** - Antígeno de linfócitos cutâneos (Cutaneous leucocyte antigen)
- DAMPs** - Padrões moleculares associados a danos (Damage-associated molecular patterns)
- DC-SIGN** - Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- ICAM-1** - Molécula de adesão intercelular 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)
- IFN- γ** - Interferon gama
- IL 10** - Interleucina 10
- IL 12** - Interleucina 12
- IL 13** - Interleucina 13
- IL 2** - Interleucina 2
- IL 4** - Interleucina 4
- IL 6** - Interleucina 6
- IL 8** - Interleucina 8
- IL-1 β** – Interleucina 1 β
- iNOS** - Óxido nítrico sintase induzível (Inducible nitric oxide synthase)
- LFA-1** - Antígeno associado à função leucocitária (Lymphocyte function-associated antigen 1)
- LV** - Leishmaniose Visceral
- LVC** - Leishmaniose Visceral Canina
- MHC-II** - Complexo principal de histocompatibilidade de classe II (major histocompatibility complex class II)
- MMP-2** - Metaloproteinase de matriz 2
- MMP-9** - Metaloproteinase de matriz 9
- MMPs** - Metaloproteinases de matriz
- NETs** – Armadilhas extracelulares de neutrófilos (Neutrophil extracellular traps)
- PAMPs** - Padrões moleculares associados a patógenos (Pathogen-associated molecular pattern)
- PPRs** - Receptores de reconhecimento padrão (Pattern recognition receptors)
- TCR** - Receptor de células T (T-cell receptor)
- Th1** - Linfócito T auxiliar 1 (T helper cells 1)
- Th17** - Linfócito T auxiliar 17 (T helper cells 17)
- Th2** - Linfócito T auxiliar 2 (T helper cells 2)
- TLRs** – Receptores tipo Toll-Like (Toll-like receptor)
- TNF- β** - Fator de necrose tumoral beta
- TNF- α** - Fator de necrose tumoral alfa

1 Introdução

1.1.0 O parasito *Leishmania*

Parasitas digenéticos do gênero *Leishmania*, possuem duas distintas formas evolutivas: formas promastigotas e amastigotas. Formas promastigotas são encontradas predominantemente em hospedeiros invertebrados, possuem flagelo e morfologia alongada. Contudo, formas amastigotas são observadas em hospedeiros mamíferos, possuem morfologia arredondada e tamanhos variáveis dependendo da espécie. (OPAS, 2019) (Figura 1.0).

Várias espécies de *Leishmania*, filogeneticamente distintas, são capazes de promover diferentes manifestações clínicas em seres humanos (WHO, 2010). De acordo com Desjeux, 2004, vinte espécies de *Leishmania*, são consideradas patogênicas. Essas espécies, compreendem aos subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* e caracterizam grande polimorfismo clínico aos seus hospedeiros através de tropismos pelas vísceras, pela pele ou pelas mucosas, dando origem à Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose mucosa (LM) e Leishmaniose mucocutânea (LMC) (OPAS,2019).

As leishmanioses, possuem transmissão principalmente vetorial através de picadas de flebotomíneos infectados popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros nomes de acordo com a localização geográfica (Brasil, 2007). Somente flebotomíneos fêmeas são hematófagas, e necessitam da alimentação sanguínea para o desenvolvimento de seus ovos (WHO, 2010).

O vetor se torna infectado através da ingestão de formas amastigotas durante o repasto sanguíneo, os quais se diferenciam em promastigotas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado. Durante nova alimentação sanguínea, fêmeas infectadas regurgitam formas promastigotas na pele do hospedeiro vertebrado, que são em seguida, fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário e se diferenciam em amastigotas, dando início à um novo ciclo (Brasil, 2006).

Hospedeiros vertebrados possuem capacidade de manter a *Leishmania* na natureza e torná-la disponível ao vetor causando persistência do ciclo de transmissão (OPAS, 2019), a partir desse fato, as Leishmanioses podem ser divididas em dois grupos: Leishmaniose zoonótica em situações em que animais são considerados hospedeiros reservatórios e

Leishmaniose antroponótica em situações em que os humanos são as fontes de infecção para o vetor (Desjeux, 2004).

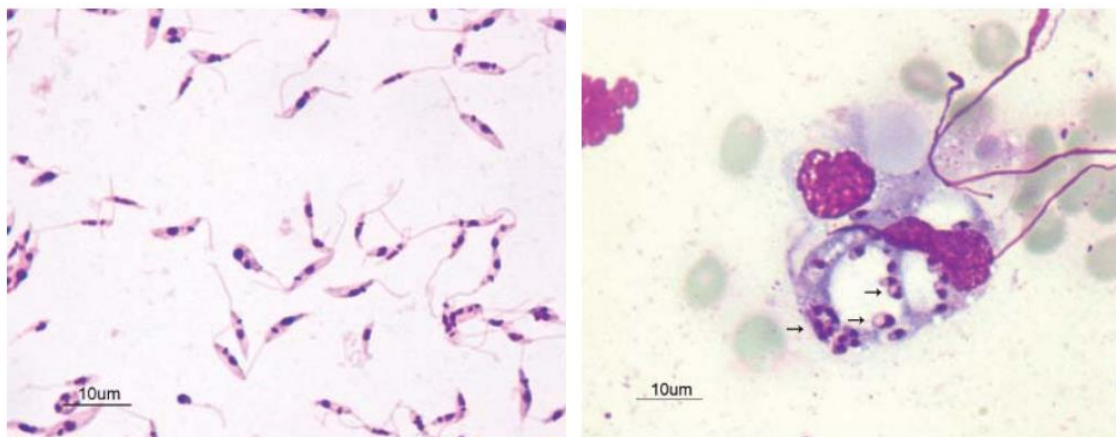


Figura.1.0 - Formas evolutivas da *Leishmania*. A- Formas promastigotas B- Formas amastigota (setas). OPAS, 2019

1.1.1 Hospedeiros Reservatórios no Contexto da Leishmaniose Visceral

O papel dos hospedeiros como reservatórios, é definido por diversos fatores. Um mamífero estar infectado não significa necessariamente que irá desempenhar um papel no ciclo de transmissão do parasito. Portanto, podem ser considerados hospedeiros incidentais. A competência do animal em se tornar reservatório é dependente da interação parasito-hospedeiro, o qual irá definir a capacidade de transmissibilidade do parasito ao vetor e a competência de manutenção do ciclo de transmissão (WHO, 2010; Roque e Jansen, 2014).

No ambiente silvestre, raposas e marsupiais são considerados os principais reservatórios, enquanto no ambiente urbano, os cães desempenham um importante papel do ciclo de transmissão da *Leishmania* e são considerados as principais fontes de infecção para o vetor (Brasil,2006). A importância de cães como principais reservatórios no ambiente urbano ocorre devido a capacidade infectante desses animais independente de manifestações clínicas (Laurenti *et al.*, 2013). Tal capacidade, apresenta correlações positivas com a carga parasitária encontrada na pele e sangue de animais infectados trazendo impactos no ciclo de transmissão do parasito (Borja *et al.*, 2016).

1.1.2 Ciclo Biológico

Espécies de *Lutzomyia* no Novo Mundo ou *Phlebotomus* no Velho Mundo, adquirem formas amastigotas de *Leishmania* durante a alimentação sanguínea (Bates, 2007 em revisão). No momento seguinte à introdução da probóscide do vetor na pele do hospedeiro infectado, capilares sanguíneos superficiais são rompidos e pequenas hemorragias subcutâneas são formadas tornando possível a sucção sanguínea em conjunto com formas amastigotas do parasito (Tempone e colaboradores, 2004). Dessa forma, para que ocorra a transmissão da *Leishmania* ao hospedeiro invertebrado, se faz necessária a disponibilidade do parasito na pele ou no sangue periférico de hospedeiros mamíferos (Brasil, 2006).

As amastigotas ingeridas pelo vetor, desenvolvem mudanças morfológicas em diferentes estágios de desenvolvimento, se comportando de diferentes modos dependendo da espécie de *Leishmania*. A forma como *L. infantum* se desenvolve no flebotomíneo (*Lu. Longipalpis*), ocorre de modo diferenciado em relação a *L. mexicana*, por exemplo, que apesar de possuírem mesma sequência morfológica de diferenciação, se diferem no tempo de duração e no pico de desenvolvimento de suas formas evolutivas (Gossage *et al.*, 2003).

Assim, as primeiras formas evolutivas que se desenvolvem no início da alimentação sanguínea, são promastigotas procíclicas, que posteriormente se diferenciam em promastigotas nectomonada, leptomonada e por fim no estágio infeccioso promastigotas metacíclicas (Dostálová e Volf, 2012 em revisão). Enquanto promastigotas procíclicas e leptomonada possuem capacidade de replicação, promastigotas metacíclicas e nectomonada são formas evolutivas não divisórias (Gossage *et al.*, 2003).

Apesar disso, após repastos sanguíneos sequentes, promastigotas metacíclicas podem se desdiferenciar em formas evolutivas proliferativas semelhantes a leptomonada através de um fenômeno denominado metaciclogênese reversa. Parasitos nesse estágio de desenvolvimento são denominados promastigotas retroleptomonada, os quais possuem baixa mobilidade, curto flagelo, grande corpo celular e capacidade proliferativa, resultando no aumento do número de promastigotas metacíclicas e na amplificação da capacidade infectante à hospedeiros mamíferos (Serafim *et al.*, 2018) (Figura 1.1).

Em hospedeiros mamíferos, após a regurgitação do parasito na pele, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos e localizadas em vacúolos parasitóforos (Courret *et al.*, 2002). Dentro dos vacúolos, o aumento da temperatura, diminuição do pH, absorção de ferro e geração de peróxido de hidrogênio, possuem um

importante papel na diferenciação de promastigotas metacíclicas em amastigotas, como revisado por Podinovskaia e Descoteaux, 2015.

Várias espécies de *Leishmania* podem induzir vacúolos morfologicamente distintos dentro de uma mesma população de macrófagos. Tal ambiente funciona como um compartimento de fácil acesso a nutrientes para amastigotas. Após a multiplicação parasitária, os parasitos rompem os macrófagos e são liberados para o meio extracelular podendo parasitar outros fagócitos e alguns tipos de células não fagocíticas. (Antoine, 1998; McConville *et al.*, 2007 em revisão).

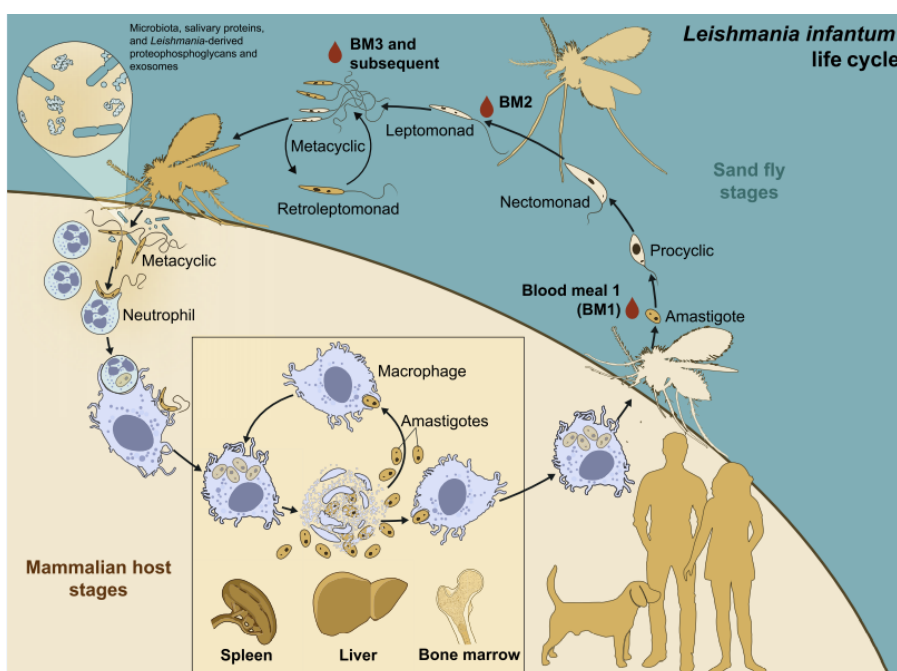


Figura 1.1 - Ciclo de vida da *Leishmania infantum*. Serafim *et al.*, 2019

1.1.3 Distribuição geográfica

A Leishmaniose visceral possui distribuição restrita, com 90% dos casos presentes na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (Alvar *et al.*, 2012). No ano de 2020, 6 países relataram mais de 1000 casos de LV representando 79% de todos os casos globalmente, sendo eles Brasil, Etiópia, Eritreia, Quênia, Índia e Sudão (WHO,2021) (Figura 1.2).

De acordo com a organização mundial da saúde (WHO, 2021), países são considerados endêmicos se pelo menos um caso autóctone foi relatado e todo o ciclo de transmissão parasitária foi demonstrada em alguma região daquele país. Dessa forma, na região das américas, 13 países foram considerados endêmicos. Dentre eles, 97% dos casos foram relatados no Brasil em 2019 (OPAS,2019).

A leishmaniose visceral é uma forma mais grave podendo levar a óbito na ausência de tratamento (OPAS, 2019). Assim, no período de 2019 a 2020, 10 países relataram 95% das mortes causadas por LV, sendo eles Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Kenya, Paraguai, Sudão, Sudão do sul, Nepal e Somália (WHO, 2021).

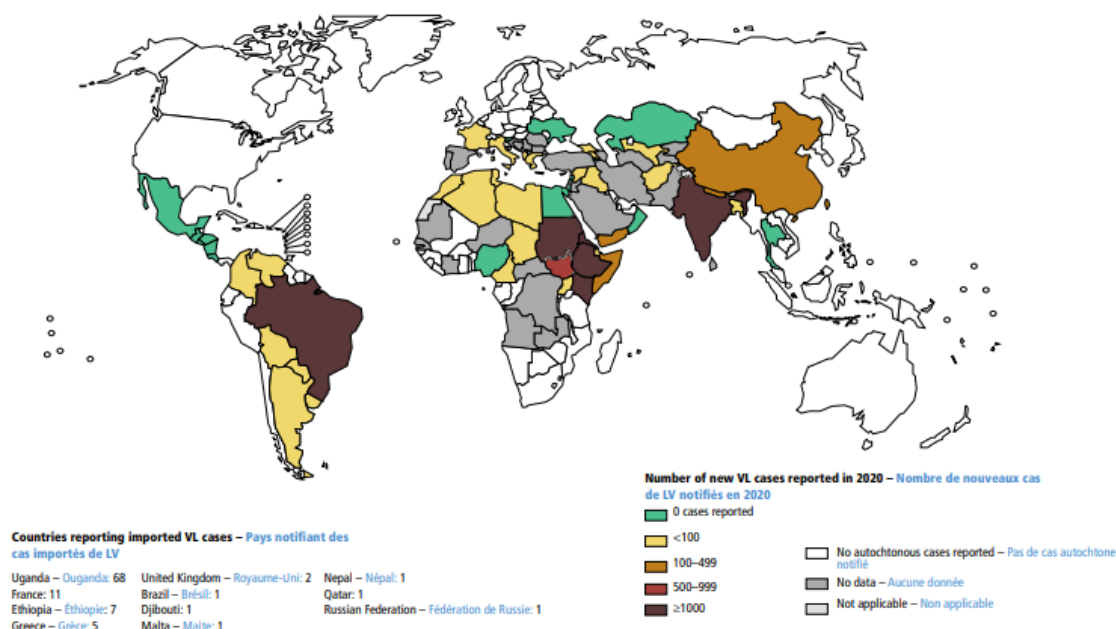


Figura 1.2 - Status da endemicidade da Leishmaniose Visceral no mundo. WHO, 2021.

1.1.4 Vetores no velho e novo mundo

Os vetores de *Leishmania*, pertencem a família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* e se diferem de outros insetos vetores por possuírem pequeno porte (até 5mm de comprimento), corpo piloso, asas com contorno lanceolado cobertas por pelos que se mantêm eretas sobre o corpo em repouso (Urquhart *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2007). São insetos que possuem metamorfose completa, possuem estágio de ovo, larva, pupa e adulto com duração de cada estágio variável de acordo com a espécie (OPAS, 2019). Embora não sejam depositados na água, os ovos necessitam de ambientes úmidos para sua sobrevivência, os quais, em condições ideais, eclodem por volta de uma a duas semanas, podendo prolongar em climas mais frios (Urquhart *et al.*, 1998). Da mesma forma que os ovos, as larvas e pupas se desenvolvem em ambientes úmidos e ricos em matéria orgânica, com tempo de desenvolvimento influenciado pelas alterações climáticas ambientais, levando menos tempo para se desenvolverem em regiões mais quentes e mais tempo de desenvolvimento em regiões mais frias (WHO, 2010).

No velho mundo, dentre as 49 espécies pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, 31 são relatadas como vetores de *Leishmania*. São predominantes na região paleártica com a maior parte das espécies habitando áreas semiáridas e de savana se distribuindo das Regiões do Mediterrâneo, Afrotropical, Oriente Médio e Oriente até à Ásia central. Em regiões tropicais, algumas espécies estão presentes na África Subsaariana, Sudeste Asiático ou na região do Pacífico (revisado por Akhoundi *et al.*, 2016).

No novo mundo, vetores do gênero *Lutzomyia* possuem ampla distribuição. Dentre as 118 espécies relatadas, 47 são responsáveis pela transmissão do parasito, as quais são mais abundantes na América tropical se distribuindo desde as áreas meridionais da região neártica até a região neotropical, sendo encontradas especialmente em áreas florestais da América do Sul e Central (revisado por Akhoundi *et al.*, 2016).

No Brasil, duas espécies de *Lutzomyia*, estão associadas à transmissão do parasito: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A *Lutzomyia cruzi*, apresenta associação com a transmissão no Estado do Mato Grosso do Sul, enquanto a *L. longipalpis* é considerada o principal vetor, apresentando ampla distribuição geográfica podendo ser encontrada no Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste, sendo inicialmente observada participando do ciclo de transmissão em áreas de mata (Brasil, 2006). Porém, na região latino-americana, o desmatamento e a substituição de florestas por áreas agrícolas fizeram com que o vetor se tornasse peridoméstico (revisado por Patz *et al.*, 2000).

Mudanças ambientais devido às ações humanas ou fenômenos naturais, causam consequências no equilíbrio ecológico e nos cenários os quais os parasitos e vetores se desenvolvem, se reproduzem e transmitem doenças (revisado por Patz *et al.*, 2000). Sendo assim, a partir da década de 1980, a leishmaniose deixou de ter um caráter rural devido aos processos de adaptação do vetor no ambiente urbano, tendo como consequência, a expansão da doença para regiões urbanas de médio e grande porte (Vilela e colaboradores, 2014).

1.2.0 Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença zoonótica que possui a *L. infantum* como agente etiológico. Representa grande importância na Europa, África, Ásia e na América podendo ser potencialmente fatal (Baneth *et al.*, 2008 em revisão). No ambiente urbano, os cães são considerados as principais fontes de infecção para o vetor (Brasil, 2006). A migração de cães de regiões endêmicas para não endêmicas e a adaptação do vetor no ambiente

urbano são importantes fatores que resultam na expansão de casos caninos de LV na América do Sul (Dantas – Torres, 2009).

Além de apresentar maior prevalência, casos de Leishmaniose Visceral em cães são observados precedendo casos de leishmaniose visceral em humanos (Camargo- Neves *et al.*, 2001; Brasil, 2006). Em determinadas regiões urbanas do Brasil, mais de 80% dos cães são assintomáticos. A ausência de sinais clínicos apresentada por cães soropositivos é considerada uma importante característica epidemiológica devido a capacidade desses animais de infectar o vetor (Dantas – Torres, 2009). Dessa forma, uma abordagem integrada deve ser utilizada em cães como medida profilática, incluindo a utilização de uma vacina eficaz em conjunto com a utilização de inseticidas tópicos ou em forma de coleiras (Solano-Gallego *et al.*, 2011)

Apesar da maioria dos animais apresentarem ausência de sinais clínicos, cães sintomáticos apresentam sintomatologia clínica semelhante a humanos com LV, representando um bom modelo de estudo. Dessa forma, o entendimento da imunopatogenia da LVC reflete no controle e na prevenção de casos de leishmaniose visceral humana (Moreno e Alvar, 2002).

1.2.1 Formas de Transmissão da LVC

A transmissão parasitária de um cão infectado a um cão não infectado ocorre através da picada do vetor flebotômico (Moreno e Alvar, 2002). Entretanto, além da forma clássica de transmissão, outras formas incomuns de disseminação do parasito foram descritas (Solano-Gallego *et al.*, 2011) (Figura 1.3). Entre elas, a transmissão de *Leishmania* através de práticas transfusionais foi comprovada experimentalmente. O potencial infectante do parasito foi preservado após a transferência de sangue total ou hemocomponentes (células mononucleares) ao animal receptor independente da condição clínica de seus doadores, fator considerado importante, visto que, esses animais podem estar infectados, mesmo não apresentando sintomatologia clínica. Tal fato, reforça a necessidade de monitoramento sorológico e parasitológico para LVC em animais doadores (Freitas *et al.*, 2006).

Além da transfusão sanguínea, a transmissão vertical/transplacentária e a transmissão venérea são outras rotas alternativas de transmissão da LVC. A presença de carga parasitária em vários tecidos, incluindo na placenta, tem como consequência, a transmissão do parasito à ninhada através do intenso fluxo sanguíneo placentário (Boggiatto *et al.*, 2011). Enquanto a presença de *Leishmania* no sêmen de animais sorologicamente positivos (Silva *et al.*, 2009) e a presença de carga parasitária em órgãos genitais de machos e fêmeas sugerem a transmissão venérea do parasito por ambos os sexos (Boechat *et al.*, 2020)

Apesar de alguns estudos terem como foco a transmissão não vetorial do parasito, os impactos dessas formas atípicas de transmissão no ciclo de vida parasitário ainda não estão esclarecidos (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Estudos de Scorza *et al.*, 2021 mostraram que cães infectados verticalmente são capazes de infectar flebotomíneos devido à alta carga parasitária observada na pele nesses animais.

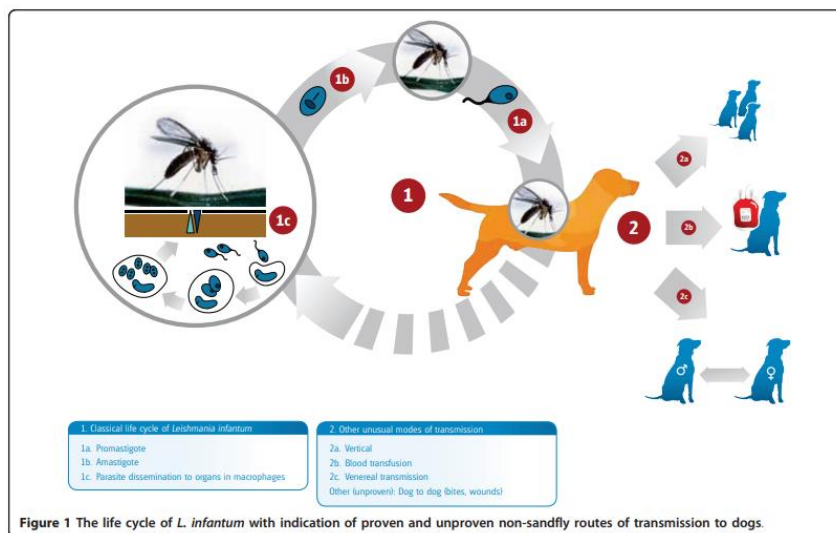


Figura 1.3 - Ciclo de vida da *Leishmania infantum* com indicação de rotas de transmissão. Solano-Gallego, 2011

1.2.2 Apresentação clínica de cães com LVC

Por ser considerada uma doença sistêmica, a LVC resulta na inespecificidade de sinais clínicos em cães acometidos pela doença (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Os sinais clínicos podem surgir logo após a inoculação de formas promastigotas na pele do hospedeiro. Dessa forma, cancras de inoculação são vistos no local da inoculação parasitária algumas semanas após a interação entre o cão e o vetor (Killick-Kendrick *et al.*, 1994). Além disso, alguns cães podem permanecer assintomáticos durante toda a vida, entretanto, em alguns animais, a ausência de sintomatologia pode não ocorrer de forma definitiva. Alguns fatores podem resultar no desenvolvimento de manifestações clínicas, como por exemplo, doenças concomitantes à LVC e imunocomprometimento os quais resultam em um desequilíbrio da resposta imune protetora (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Em animais sintomáticos, o curso da doença ocorre de forma progressiva e as manifestações clínicas se desenvolvem de forma gradual (Ciaramella *et al.*, 1997). Sendo assim, as queixas de tutores ao levar seus cães à consulta médica são diversas, e variam desde intolerância ao exercício, diminuição do apetite, perda

progressiva de pelo e lesões de pele à sinais oculares, respiratórios e gastrointestinais (Koutinas *et al.*, 1999).

Ao exame clínico, as lesões de pele são frequentemente observadas e podem se apresentar de forma isolada ou associadas a outros sinais clínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Meléndez-Lazo *et al.*, 2017). Dentre as lesões cutâneas, alguns sinais incluem: dermatite esfoliativa não pruriginosa com ou sem alopecia, dermatite ulcerativa, dermatite nodular, dermatite papular, dermatite pustular, onicogribose e hiperqueratose (Saridomichelakis e Koutinas, 2014 em revisão; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Além de sinais clínicos dermatológicos, a presença de linfadenopatia, esplenomegalia, ascite, palidez de mucosa, perda de peso, febre, epistaxis e sinais clínicos oculares incluindo uveíte, conjuntivite, ceratoconjuntivite seca e blefarite são manifestações que podem caracterizar a doença ao exame clínico (Ciaramella *et al.*, 1997; Baneth *et al.*, 2008).

Além disso, manifestações a nível renal também podem ser um importante indicador da doença. O paciente pode aumentar seu tempo de vida se tiver um diagnóstico precoce (Solano-Gallego *et al.* 2009), uma vez que, a progressão da doença resulta em insuficiência renal crônica, o qual é a principal causa de morte em cães com LVC (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Outros sinais clínicos observados incluem: lesões articulares e ósseas, atrofia muscular progressiva, hematúria e diarreia hemorrágica (Baneth *et al.*, 2008 em revisão).

A ampla variedade de manifestações clínicas ou a presença de doenças infecciosas e parasitárias concomitantes apresentadas por esses animais resulta em um diagnóstico complexo. Dessa forma, uma abordagem diagnóstica completa deverá ser realizada e adaptada de forma individual para cada cão (Solano-Gallego *et al.*, 2011).



Figura 1.4 - Manifestações clínicas e características imunológicas da infecção por *Leishmania infantum* em cães. Solano-gallego *et al.*, 2011

1.2.3 Lesões de pele em cães com LVC

O acometimento da pele é comumente observado em cães com LVC (Ordeix *et al.*, 2017; Solano-Gallego *et al.*, 2004; Ordeix *et al.*, 2005; Ciaramella *et al.*, 1997), representando cerca de 78,4 a 81% dos sinais clínicos observados ao exame clínico (Meléndez-Lazo *et al.*, 2018; Koutinas *et al.*, 1999). Além de ser visto em pele lesionada, lesões microscópicas e a presença de carga parasitária também podem ser observadas em fragmentos de pele clinicamente saudáveis (Saridomichelakis e Koutinas., 2014 em revisão). Nesses fragmentos, a intensidade do infiltrado celular é observado de forma mais branda em comparação à pele com lesões macroscópicas, variando entre leve a moderado e apresentando padrões inflamatórios localizados entre regiões perivasculares à intersticiais (Ordeix *et al.*, 2017). Ao mesmo tempo que em fragmentos de pele lesionada, o infiltrado inflamatório é composto principalmente por macrófagos, seguido por pequeno número de linfócitos, plasmócitos e raros neutrófilos (Koutinas *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2004) com intensidade variando de moderado a intenso e distribuído de forma nodular a difusa (Ordeix *et al.*, 2017).

Em cães com sintomatologia clínica, a dermatite esfoliativa é observada com grande frequência. Dessa forma, é considerada a principal lesão cutânea observada nesses animais ao exame clínico (Koutinas *et al.*, 1999). Podem estar distribuídas de forma difusa ou multifocal apresentando simetria (Papadogiannakis *et al.*, 2005) e padrões descamativos do tipo micácea e furfurácea que apresentam cor branca a prateada (Torres-Neto *et al.*, 2008). Ao analisar microscopicamente a pele desses animais, Papadogiannakis *et al.*, (2005), observaram infiltrado inflamatório localizados em regiões perivasculares superficiais e profundas, dermatite intersticial, dermatite periglandular, perifoliculite e adenite sebácea.

Cães com leishmaniose visceral podem apresentar vários sinais clínicos dermatológicos ou somente apresentar sinal clínico cutâneo único (Saridomichelakis e Koutinas, 2014). Assim, animais que apresentam pápulas como único sinal clínico, aparentam possuir imunocompetência específica à leishmania, uma vez que representam uma resposta benigna à infecção devido à boa resposta clínica ao tratamento e ausência de recidivas caracterizando um prognóstico favorável ao paciente (Ordeix *et al.*, 2005).

Além dos sinais clínicos mencionados, outras manifestações cutâneas são vistas com frequência, incluindo: alopecia, dermatite ulcerativa, dermatite nodular (Ferrer *et al.*, 1988), dermatite pustular, hiperqueratose nasal e de coxim e onicogribose (Saridomichelakis e Koutinas, 2014).

1.3.0 A pele

A pele, em conjunto com suas estruturas formam um dos mais extensos sistemas orgânicos do corpo animal. Além de suas funções regulatórias e sensoriais, o sistema tegumentar, é responsável pela proteção contra agentes externos, funcionando como uma barreira fundamental entre o ambiente interno e externo do corpo (Colville & Bassert, 2010). Além disso, a complexa interação entre os componentes da pele e o sistema imunológico faz com que a pele desempenhe muitas outras funções além de ser uma barreira protetora (Jones; Hunt; King, 2000). É formada pela epiderme, derme e tecido subcutâneo, possuindo características estruturais variáveis de acordo com a espécie, raça e a localização em que é observada (Colville & Bassert, 2010).

1.3.1 A estrutura da pele canina

A estrutura da pele canina é constituída por dois estratos bem definidos: uma lâmina epitelial de superfície (epiderme) formada por um epitélio pavimentoso estratificado de espessura variada e uma lâmina de tecido conjuntivo profunda (derme) rica em colágeno. Juntos, esses dois estratos, possuem uma íntima associação recobrando todo o tecido subcutâneo (Thomsett, 1986; Getty, 1975; Jones; Hunt; King, 2000). A estrutura e a espessura da pele dos animais domésticos variam de acordo com a raça, idade e sexo em certas espécies (Swenson e Reece, 1996). No cão, a pele possui variações de espessura, de acordo com a região que é observada, comprimento e cor nas diferentes raças (Getty, 1975; Schwarzet al., 1979).

A epiderme, é formada por uma camada superior cornificada com células queratinizadas (camada córnea) e uma camada inferior de células viáveis (camada basal) podendo ser subdividida em quatro camadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (Swenson e Reece, 1996; Jones; Hunt; King, 2000). Os principais tipos celulares encontrados na epiderme são: queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans. É uma região avascular e recebe nutrientes pelo fluido intersticial que se difunde para cima a partir da derme (Colville & Bassert, 2010). A derme compõe a maior parte da pele e é responsável pela sua resistência estrutural. É composta por tecido conjuntivo fibroelástico denso que contém colágeno, fibras elásticas e reticulares, folículos pilosos, terminações nervosas, glândulas, musculo liso, vasos sanguíneos e vasos linfáticos. A derme se divide em derme papilar (adjacente a epiderme) e derme reticular.

A parte superficial da derme, estrato papilar, é envolvida por papilas que se adaptam às depressões correspondentes da epiderme. As projeções descendentes da epiderme interdigitam-se com as projeções ascendentes da derme denominadas papilas dérmicas. As interdigitações ajudam a cimentar a epiderme e a derme juntas, portanto, são mais pronunciadas em áreas de maior intensidade de fricção. (Getty, 1975; Swenson e Reece, 1996; Colville & Bassert, 2010; Jones; Hunt; King, 2000). O tecido subcutâneo é uma camada espessa que se localiza abaixo da derme. É composta de forma predominante pelo tecido adiposo e é constituída por um tecido conjuntivo frouxo rica em adipócitos, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos conectando a pele com estruturas subjacentes tal como músculos e ossos (Colville & Bassert, 2010; Swenson e Reece, 1996; Jones; Hunt; King, 2000).

1.3.2 Diferenças entre a vascularização cutânea de cães e humanos

O plexo vascular da pele de cães se difere do plexo vascular da pele humana. Em cães, o plexo subdérmico é formado por ramos terminais de vasos cutâneos diretos, artérias cutâneas diretas são responsáveis pelo suprimento sanguíneo em grandes áreas da pele. Elas ocorrem paralelas à pele, na hipoderme, e surgem como artérias perfurantes, diferente de humanos, os quais possuem vasos musculocutâneos em orientações perpendiculares. (Tobias e Johnston, 2012; Castro, JLC *et al.*, 2015) (Figura 1.5).

Nos animais domésticos, a vascularização da pele é dividida em três níveis interconectados, os ramos terminais das artérias e veias dos vasos cutâneos diretos vão formar o plexo subdérmico (profundo ou subcutâneo), plexo cutâneo (médio) e plexo subpapilar (superficial), (Slatter, 2003; Castro, JLC *et al.*, 2015). Ramos do plexo subdérmico, ascendem na derme para formar o plexo cutâneo. Ramos do plexo cutâneo ascendem e descendem na derme para suprir estruturas dérmicas. Radicais do plexo cutâneo ascendem para suprir o plexo superficial. Capilares do plexo superficial, projetam nos corpos papilares dérmicos para suprir a papila epidérmica e a epiderme adjacente. O arranjo vascular geral está presente em toda pele, mas algumas variações são observadas dependendo da região do corpo em que é observado (Slatter, 2003).

Em comparação aos seres humanos, a pele de cães apresenta extensas conexões entre os plexos vasculares, fornecendo um intenso fluxo colateral para áreas adjacentes da pele (Tobias e Johnston, 2012).

Durante a infecção por *Leishmania*, a carga parasitária associada aos plexos vasculares dérmicos de cães já foi observada, sugerindo uma disseminação hematogênica do parasita (Solano-Gallego *et al.*, 2004; Ordeix *et al.*, 2017), entretanto, a associação entre a carga parasitária e a vascularização dérmica e a disseminação parasitária pela pele não estão completamente estabelecidas.

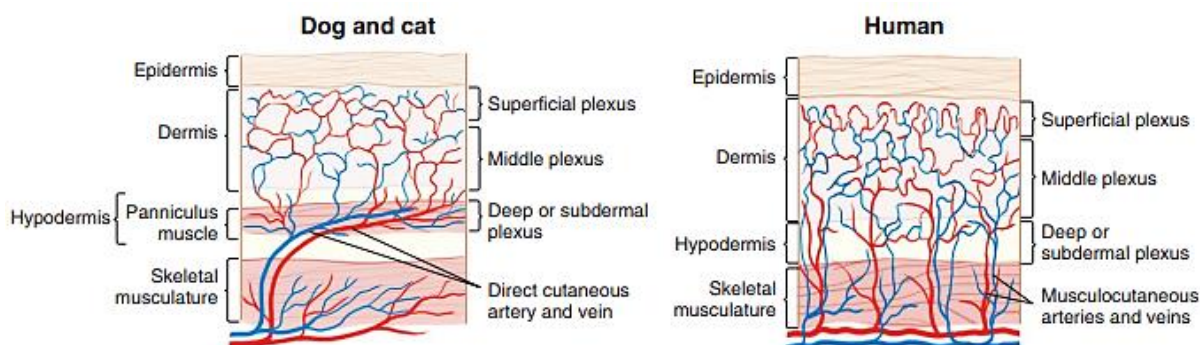


Figura 1.5 - Vascularização cutânea em cães, gatos e humanos. Tobias e Johnston, 2012

1.4.0 Células imunes da pele

O sistema imune da pele é composto por grupos celulares distintos que fornecem defesas imunes ativas contra patógenos (Abbas, 2015). Assim, para que a pele desempenhe suas funções de forma adequada, faz-se necessária uma estreita comunicação entre diferentes tipos celulares (Richmond e Harris, 2014) (Figura 1.6).

As alterações vasculares durante o processo inflamatório desempenham um importante papel durante processos infecciosos promovendo a migração de células do sistema imune para os tecidos. Tal migração envolve a participação de selectinas, quimiocinas e integrinas que atuam em conjunto através de etapas sequenciais que incluem: 1 - rolamento de leucócitos pelo endotélio 2- aumento de afinidade das integrinas 3- adesão estável de leucócitos 4- transmigração endotelial (Abbas,2015).

Durante a infecção por *Leishmania*, após a regurgitação de formas promastigotas na pele, células da imunidade inata do sistema imune cutâneo são as primeiras linhas de defesa conta a infecção, entretanto, uma efetiva interação entre a resposta imune inata e adaptativa irá desempenhar um importante papel na resistência do cão ao parasito (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão).

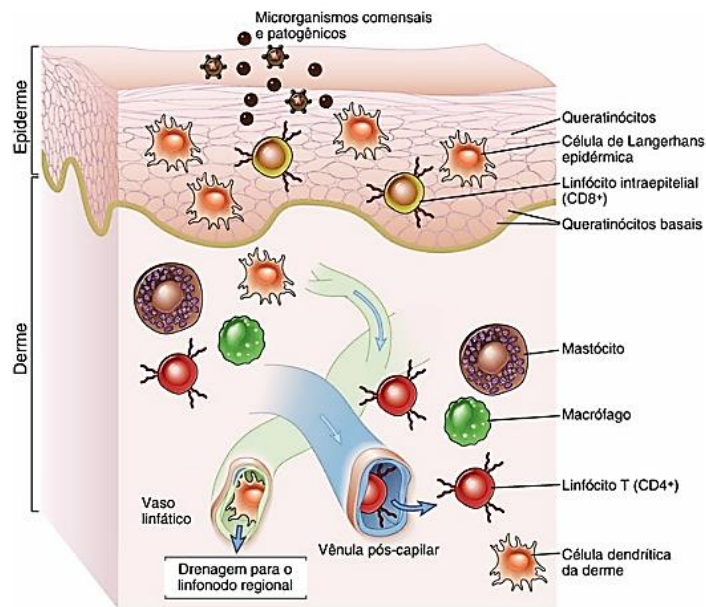


Figura 1.6 - Componentes celulares do sistema imune cutâneo. Abbas, 2015.

1.4.1 Queratinócitos

Além de promover uma barreira física, os queratinócitos participam ativamente como células de defesa, sendo capazes de produzir uma complexa mistura de citocinas após sua estimulação, promovendo e regulando as respostas imunes (Tizard, 2014, Abbas, 2015). Após injúria tecidual, a ruptura da membrana celular dos queratinócitos resulta na liberação de grandes quantidades de IL-1 que estavam armazenadas em seu citoplasma para o tecido adjacente iniciando a cascata inflamatória. Além disso, essas células são capazes de liberar citocinas e quimiocinas que resultam no recrutamento de células imunes para o local da lesão (Spellberg, 2000). Portanto, assim como outras células do sistema imune inato, os queratinócitos desempenham um importante papel após a inoculação parasitária, constituindo um ambiente adequado para a migração e ativação de leucócitos. (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão).

Após o contato com o parasito, interações com a superfície celular ou fatores liberados após a internalização resultam em elevada expressão de IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β por essas células (Scorza *et al.*, 2017). Em cães com baixa carga parasitária, moléculas de MHC classe II são expressas por essas células. Entretanto, em cães que apresentam carga parasitária elevada, isso não é observado, indicando predominância de resposta Th1 à nível da pele e uma resposta local efetiva (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão).

1.4.2 Células de Langerhans

As células de Langerhans são células dendríticas residentes da epiderme. Essas células se conectam fortemente com queratinócitos através de processos dendríticos que se irradiam por todas as direções (Richmond e Harris, 2014). Além de apresentar uma rede extensa de dendritos, essas células apresentam vários receptores de reconhecimento de padrão (PPRs), entre eles, langerina uma lectina do tipo C, e DC-SIGN e grânulos citoplasmáticos de Birbeck (Tizard, 2014).

Ao entrar em contato com patógenos, células de Langerhans são ativadas, perdem sua capacidade de adesão à epiderme e migram através de vasos linfáticos dérmicos. Durante a migração, expressam CCR7 em sua superfície e em resposta a citocinas são direcionadas à zona de células T de linfonodos drenantes (Abbas, 2015).

Após a inoculação de *Leishmania* na pele, no instante em que ocorre a migração de macrófagos e neutrófilos para o local, células de Langerhans migram da epiderme para a derme para promover a fagocitose de formas promastigotas e posterior migração para os linfonodos (Figura 1.7). Essas células processam o parasito em seu citoplasma e promovem apresentação antigênica à linfócitos T através da expressão de MHC II (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão).

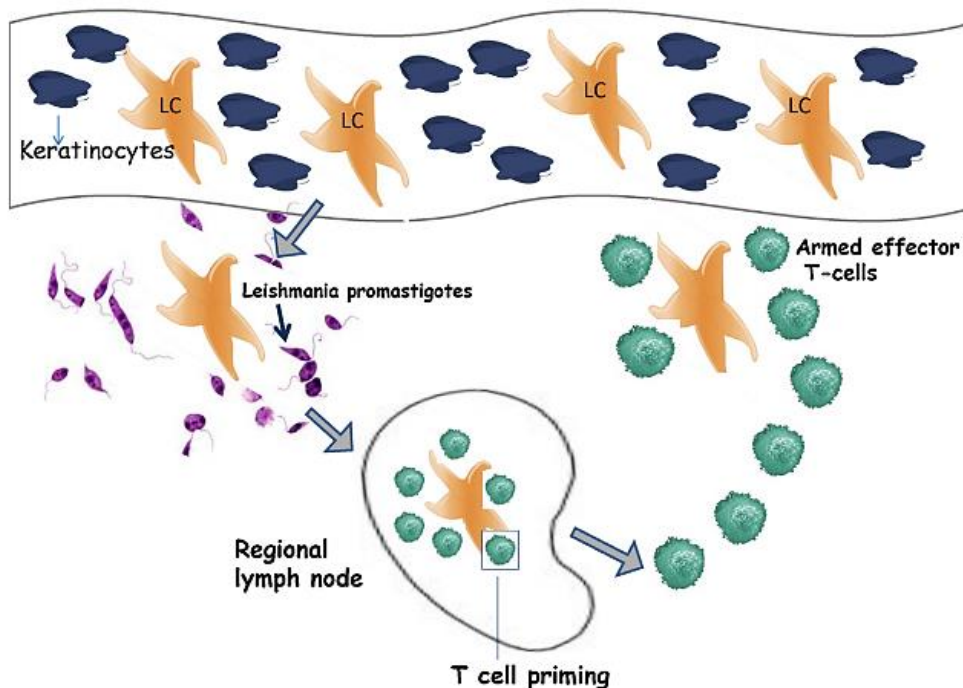


Figura 1.7 - Papel das células de Langerhans durante a infecção por *Leishmania*. Papadogiannakis e Koutinas, 2015

1.4.3 Células Dendríticas

Em comparação com células de Langerhans, células dendríticas dérmicas apresentam maior capacidade de motilidade para migrar através de fibras de colágeno na derme (Richmond e Harris, 2014). Além disso, apresentam variados receptores do tipo *Toll-Like* (TLR), que as tornam potentes sensores de PAMPs e DAMPs (Abbas, 2015).

A maturação de células dendríticas ocorre através de estímulos por IL1, TNF- α , PAMPs e DAMPs. Assim, apesar de sua capacidade de apresentar antígenos, células dendríticas possuem capacidade de eliminar patógenos através da produção de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase (NOX). Portanto, a ativação de TLRs por PAMPs aumenta a produção de superóxido por essas células (Tizard, 2014)

Após a inoculação de formas promastigotas na derme, a ativação de receptores do tipo *Toll-Like* em células dendríticas resulta na expressão de IL-8 e consequente recrutamento de neutrófilos para o local (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão). A maioria das células dendríticas da pele são células dendríticas clássicas e após internalização e processamento de antígenos, migram para os linfonodos para posterior apresentação antigênica à linfócitos T através da interação entre MHC II e TCR. Tal migração ocorre devido a ligação entre quimiocinas e o CCR7 presente em células dendríticas, os quais irão direcionar essas células para os linfonodos para posterior apresentação antigênica (Abbas, 2015).

Durante a infecção por *Leishmania*, essas células desempenham um importante papel do desenvolvimento de respostas mediadas por células através da expressão de altos níveis de IL-12 (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão). A produção de IL-12 por células dendríticas são importantes na polarização de linfócitos T *naïve* em um fenótipo Th1 (Liu e Uzonna, 2012). Portanto, células dendríticas são células apresentadoras de antígeno mais especializadas e mais importantes para a ativação de células T mediando interações entre respostas imunes inatas e adaptativas (Abbas, 2015).

1.4.4 Macrófagos

Após a inoculação de formas promastigotas de *Leishmania* na pele do cão, considerável número de parasitos é eliminado por ação do sistema complemento (Solbach e Lascay, 2000). Os parasitos sobreviventes, aderem a macrófagos e células dendríticas residentes através de receptores I (CD35) e III (CD11b/CD18) do complemento presentes na superfície dessas células, os quais irão facilitar a internalização parasitária por fagocitose (Papadogiannakis e

Koutinas, 2015 em revisão). Em cães suscetíveis, a capacidade fagocítica dessas células se torna reduzida e a disseminação parasitária pode ocorrer dentro de horas, enquanto em cães resistentes o parasito pode permanecer na pele ou em linfonodos regionais (Manolis N. Saridomichelakis, 2009).

Na pele de cães com leishmaniose visceral canina, macrófagos consistem na principal célula presente no infiltrado inflamatório dérmico durante a progressão da doença (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão). Os monócitos circulantes migram para o tecido, se diferenciam em macrófagos, fagocitam e processam patógenos para apresentação antigênica à linfócitos T efetores através do complexo peptídeo-MHC (Abbas, 2015).

Vários sinais podem resultar na ativação de macrófagos, induzindo ao desenvolvimento de subconjuntos funcionalmente distintos responsáveis por diferentes desfechos durante a infecção por *Leishmania*. Portanto uma ativação adequada dessas células é essencial para a eliminação do parasito (Liu e Uzonna ,2012).

A ativação clássica de macrófagos mediada por IFN- γ e Th1, resulta em um fenótipo pró-inflamatório (Abbas,2015). Macrófagos ativados por essa via são denominados M1 e apresentam maiores expressões de MHC II em sua superfície, tornando-se apresentadores de antígenos eficientes. Além disso, possuem alta motilidade em resposta ao estímulo quimiotático, maior avidéz em comparação à outros tipos celulares e produzem altos níveis de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Tizard, 2014). Dessa forma, irá ocorrer a catalização de *L-arginina* e geração de óxido nítrico (Liu e Uzonna ,2012). A produção de oxido nítrico em fagolisossomo de macrófagos é o principal mecanismo de eliminação parasitária. Entretanto, em cães suscetíveis, a expressão de oxido nítrico é comprometida devido à redução de sinais entre moléculas coestimulatórias, favorecendo a sobrevivência do parasito (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão).

Por outro lado, a ativação alternativa de macrófagos, mediada por IL-4 e IL13, resulta em um fenótipo anti-inflamatório e de reparação tecidual (Abbas, 2015). Macrófagos ativados por essa via são denominados M2 e expressam baixa quantidade de citocinas pró-inflamatórias e altas concentrações de IL-10 (Tizard, 2014), que irão regular negativamente a capacidade parasitocida de macrófagos infectados, favorecendo a proliferação e sobrevivência parasitária (Liu e Uzonna ,2012).

1.4.5 Neutrófilos

Após a ativação de macrófagos e/ou células dendríticas em resposta à PAMPs durante processos infecciosos, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para a pele e

possuem capacidade de fagocitar e matar patógenos eficientemente (Richmond e Harris, 2014). Tal recrutamento ocorre devido à abundante e precoce expressão de CXCL8 (IL-8) por macrófagos e células dendríticas residentes (Abbas, 2015). Na Leishmaniose, a ativação de receptores *Toll-Like* (TLRs) em células dendríticas dérmicas induz a liberação de IL-8 que promove o recrutamento de neutrófilos para o local de inoculação parasitária (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão). Assim, neutrófilos são as primeiras células a chegarem no local de inoculação do parasito e desempenham um importante papel durante a resposta inicial (Toepp e Petersen, 2020).

Para que ocorra a migração de neutrófilos para o local de infecção, o movimento através do endotélio e parede dos vasos sanguíneos para o meio extravascular se faz necessário. Assim, quimiocinas e moléculas de adesão são expressas. A adesão de neutrófilos em células endoteliais ativadas por IL-1, TNF- α , ou por outras citocinas no local de inflamação, ocorre através da expressão de L-selectina por neutrófilos (CD62L) (Abbas, 2015). A L-selectina presente em neutrófilos se adere à P-selectina presente em células endoteliais promovendo uma ligação transitória e o rolamento de neutrófilos através do endotélio (Tizard, 2014). Após o processo de rolamento, a expressão do antígeno associado à função leucocitária 1 (LFA-1) por neutrófilos e a posterior adesão em molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1 ou CD54) presentes em células endoteliais, faz com que essas células fiquem firmemente aderidas à superfície do endotélio independente da força exercida pelo fluxo sanguíneo, assim, por influência de quimiocinas, ocorre a migração de neutrófilos para o tecido através do aumento da permeabilidade vascular e a abertura de fendas entre as células endoteliais provocadas pelo próprio neutrófilo (Tizard 2014).

Após a chegada no tecido, neutrófilos fagocitam o parasito *Leishmania* e induzem a liberação de TNF- α e IFN- γ que recrutam e ativam macrófagos para o tecido infectado (Toepp e Petersen, 2020). Apesar da rápida adesão à superfície do neutrófilo, formas promastigotas de *L.infantum*, se aderem preferencialmente à essas células pela ponta do flagelo. Entretanto, apesar da alta capacidade de interação entre o parasito e o neutrófilo, fatores genéticos, raça, idade e estilo de vida individual de cada cão pode interferir na capacidade fagocítica de neutrófilos (Pereira *et al.*, 2017).

Durante a doença clínica, tem sido sugerido que o parasito induza a apoptose recente de neutrófilos, promovendo um mecanismo de cavalo de Tróia, permitindo a sobrevivência parasitária em vacúolos parasitóforos após a fagocitose de neutrófilos por macrófagos sem sinais inflamatórios, resultando na sobrevivência parasitária (Toepp e Petersen, 2020).

Além disso, neutrófilos são capazes de liberar seu DNA associado a proteínas do citoplasma para o meio extracelular, estruturas denominadas armadilhas extracelulares de

neutrófilos (*neutrophil extracellular traps* - NETs) (de Menezes *et al.*, 2016). Em comparação a outros tipos de morte celular, como apoptose e necrose, a desintegração do envelope nuclear, perda de membranas internas, contato da cromatina com componentes do citoplasma e a perda de organelas citoplasmáticas, são características morfológicas marcantes de neutrófilos ativado formadores de NETs (Fuchs *et al.*, 2007).

As amastigotas capturadas por NETs, possuem aparência danificada, indicando dano celular (Guimarães-Costa *et al.*, 2009). Apesar dessas observações, estudos vem demonstrando papéis divergentes entre NETs e a eliminação parasitária. A íntima interação de NETs com os monócitos, regulam negativamente a expressão do receptor de IL-4, interrompendo a diferenciação total dos monócitos em células dendríticas, afetando a capacidade de eliminar o parasito (Guimarães-Costa *et al.*, 2017).

1.4.6 Linfócitos

Após a fagocitose e processamento por células apresentadoras de antígenos, peptídeos de *Leishmania* são apresentados aos linfócitos T através da interação do MHC com TCR a fim de estimular células T virgens a proliferar e se diferenciar em células T efetoras (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão). Após ativação, células T efetoras saíram dos linfonodos para os vasos sanguíneos em direção ao tecido alvo (Richmond Harris, 2014). Dessa forma, além de induzir a ativação e diferenciação em células efetoras em linfonodos drenantes, células dendríticas induzem a expressão de moléculas de *homing* em linfócitos, entre eles o antígeno de linfócitos cutâneos (CLA), CCR4, CCR8 e CCR10 direcionando essas células para a pele. A migração de células T para a pele ocorre de forma dependente da ligação do CLA em linfócitos com E-selectina presente no endotélio de vasos sanguíneos, assim como a expressão de CCR4, CCR8 e CCR10 e interação com suas respectivas quimiocinas CCL17, CCL1 e CCL27 (Abbas, 2015). Dessa forma, diferentes subpopulações de linfócitos T podem ser observados no tecido cutâneo (Richmond Harris, 2014).

Dentre as várias subpopulações de linfócitos T CD4+, três tem sido bem descritas na literatura: linfócito T auxiliar 1 (Th1), auxiliar 2 (Th2) e auxiliar 17 (Th17) (Tizard, 2014). A diferenciação de linfócitos para um perfil Th1, ocorre através da expressão de IL-12 e IFN- γ por APCs (Liu e Uzonna, 2012). A responsividade de células T CD4 à IL-12 e sua capacidade em manter seu receptor correspondente ativo por mais de 48h após a inoculação parasitária irá definir a resistência ou suscetibilidade à infecção por *L. infantum* (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão). Essas células, após serem ativadas, secretam IL-2, IFN- γ , TNF- α e linfotóxina (TNF- β) promovendo uma resposta imune celular eficiente contra patógenos

intracelulares (Tizard, 2014). Além disso, a expressão de IFN- γ por essas células faz com que mais células se diferenciem para um perfil Th1, amplificando a reação e inibindo a geração de Th2 e Th17 (Abbas, 2015). Em cães com a doença subclínica, células Th1 desempenham um importante papel na inibição do crescimento parasitário impedindo a progressão da doença através da expressão de IFN- γ e consequente indução da atividade efetora de macrófagos (Toepp e Petersen, 2020).

Cães infectados por *L. infantum* apresentam padrões mistos de resposta do tipo Th1 e Th2 (Baneth *et al.*, 2008) (Figura 1.8). Assim, durante a doença clínica, alterações na expressão de citocinas e a exposição prolongada ao antígeno, induzem uma alteração de respostas de células T para uma resposta regulatória aumentando os níveis de IL-10 resultando na diminuição de células Th1 efetoras produtoras de IFN- γ e tornando reduzida a capacidade de eliminação parasitária por macrófagos (Toepp e Petersen, 2020). Células T que apresentam um perfil Th2, induzem alta produção de anticorpos e expressão de IL-4, desviando a resposta imune para uma imunidade humoral e regulação negativa da resposta imune celular (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão). Dessa forma, a interação entre a resposta imune humoral e celular desempenham um importante papel durante a progressão da LVC e o aumento dos níveis de anticorpos inespecíficos e consequente hipergamaglobulinemia, resultando na deposição de imunocomplexos e desencadeamento da produção de IL-10 por macrófagos (Toepp e Petersen, 2020). Assim, uma resposta imune humoral acentuada resulta na falha do controle da carga parasitária (Baneth *et al.*, 2008).

Na pele de cães com LV, o maior número de plasmócitos em comparação à linfócitos T no infiltrado inflamatório dérmico promove a expressão de IL-4, IL-13 e TNF- α indicando resposta imune humoral mediada por Th2. Assim, o aumento da resposta imune humoral na pele de cães infectados se associa a piora dos sinais clínicos (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão).

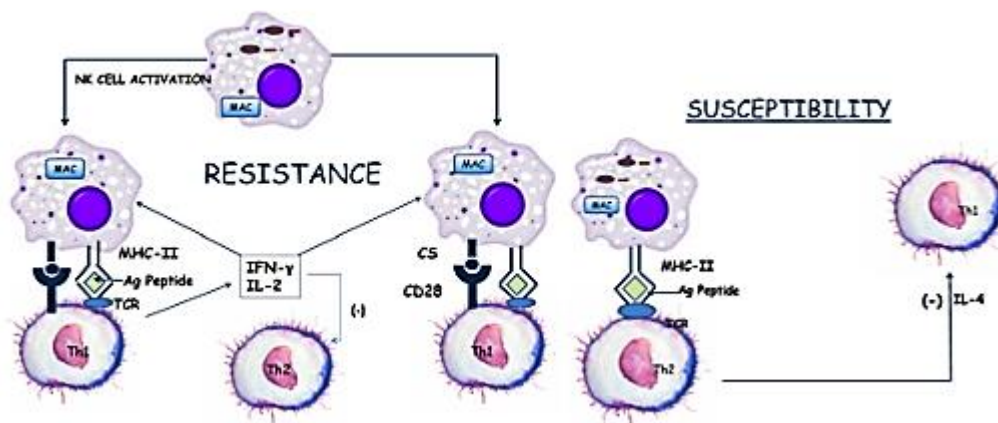


Figura 1.8 - Resistencia ou Suscetibilidade de acordo com a polarização de linfócitos T. Papadogiannakis e Koutinas, 2015.

1.5 Matriz extracelular durante a infecção por *Leishmania*

Após a inoculação parasitária na pele, a interação entre a probóscide do vetor e o tecido subcutâneo resulta na ruptura da derme provocando danos significativos na matriz extracelular induzindo a ativação de cicatrização de feridas através da ação de células do sistema imune, fibroblastos, fatores de crescimento e citocinas (de Menezes *et al.*, 2016).

Quimiocinas secretadas por fibroblastos podem interferir no tipo celular presente no infiltrado inflamatório, se tornando um elo entre a resposta imune inata e adaptativa (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão). Além disso, fibroblastos são responsáveis pela síntese de colágeno tipo I, que consiste no principal componente da matriz extracelular dérmica (de Menezes *et al.*, 2016).

Amastigotas de *L. infantum* podem parasitar fibroblastos utilizando essas células como um mecanismo de evasão da resposta imune por serem mal produtoras de óxido nítrico (Papadogiannakis e Koutinas, 2015 em revisão). Assim, o parasitismo de *Leishmania* em fibroblastos ou estímulos recebidos por essas células durante o processo inflamatório podem contribuir para a expressão de enzimas degradantes de matriz extracelular como as metaloproteinases (MMPs) (Jacintho *et al.*, 2018). Macrófagos M2, fibroblastos e mastócitos ativados expressam MMPs (Abbas, 2015), como por exemplo a MMP-2 e MMP-9, e a degradação de colágeno dérmico se associa a formação do infiltrado inflamatório (Jacintho *et al.*, 2018).

Em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, a expressão de MMP-2 e MMP-9 induz a uma intensa degradação do colágeno tipo I (Jacintho *et al.*, 2018). Além disso, a carga parasitária na pele em conjunto com o processo inflamatório resulta em uma reorganização de matriz extracelular promovendo redução do colágeno tipo I e aumento do colágeno tipo III (Giunchetti *et al.*, 2006). Tal fato, pode contribuir para a disseminação parasitária favorecendo a migração de macrófagos infectados para os vasos sanguíneos dérmicos (Jacintho *et al.*, 2018).

2 Objetivos

2.0 Objetivo Geral

Avaliar as alterações inflamatórias e vasculares na pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e sua relação com a disseminação e persistência parasitária em cães com diferentes escores clínicos.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as alterações histopatológicas da pele com enfoque nas alterações vasculares
- ✓ Analisar quantitativamente e qualitativamente a presença de amastigotas na pele
- ✓ Realizar análises morfométricas dos vasos sanguíneos dérmicos
- ✓ Avaliar as alterações de colágeno da matriz extracelular
- ✓ Verificar a correlação entre os dados obtidos, a carga parasitária e o escore clínico.

3 Metodologia

3.0 Desenho experimental

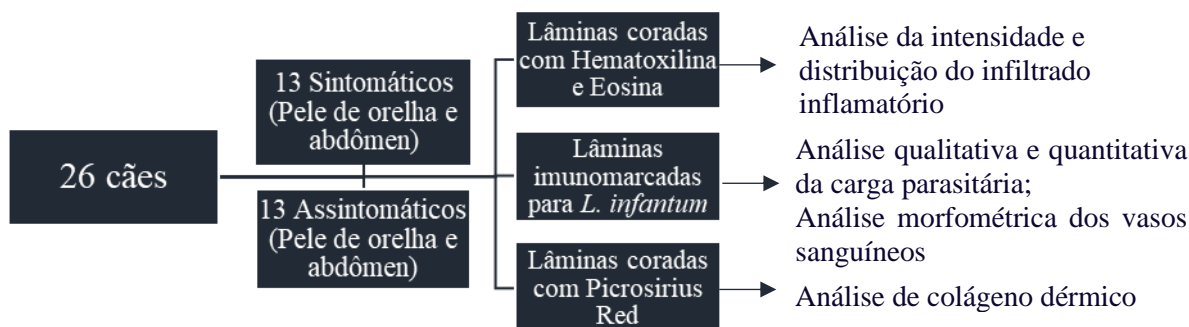


Figura 3.0 - Desenho experimental. Demonstração da organização dos experimentos

Vinte e seis cães foram selecionados para esse estudo, sendo eles treze assintomáticos e treze sintomáticos. Para cada cão, foram coletadas amostras de pele de distintas regiões do corpo para posterior análise comparativa levando em consideração a vascularização da pele. Foram selecionados fragmentos de pele que apresentam maior vascularização (orelha) e fragmentos de pele menos vascularizados (abdômen) para análise histopatológica. Para cada amostra, foram realizadas lâminas: 1- coradas com Hematoxilina e Eosina para avaliação da intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório, 2- lâminas imunomarcadas para *L. infantum* para avaliação qualitativa e quantitativa da carga parasitária e análise morfométrica dos vasos sanguíneos e 3- lâminas coradas com Picrosirius Red para análise de colágeno dérmico. As lâminas avaliadas nesse estudo foram coradas e imunomarcadas no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas INI – FIOCRUZ.

3.1 Aspectos éticos

As amostras clínicas de cães diagnosticados com LV foram oriundas de necrópsias realizadas pelo Centro de Controle de Zoonoses e encaminhados para a eutanásia de acordo com as recomendações do ministério da saúde. Todas as amostras de pele de cães naturalmente infectados incluídas neste estudo pertencem a um banco de amostras clínicas do Laboratório de Toxoplasmose e Outras Protozooses (LabToxo) e foram coletadas previamente em Cuiabá – MT com a colaboração do Centro de Controle de Zoonoses. Não houve experimentação animal,

portanto, não houve necessidade de licença segundo orientação do Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz e a lei brasileira 11794/08. O acesso ao patrimônio genético está cadastrado e certificado no SISGEN pelo número A76E438.

3.2 Animais e avaliação clínica

Vinte e seis cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Cuiabá junto a Secretaria Estadual de Saúde do Mato Grosso foram avaliados. Somente cães com diagnóstico confirmado de leishmaniose visceral por DPP e ELISA (Bio- Manguinhos), e por esse motivo, encaminhados para eutanásia pelo serviço de controle de zoonoses foram incluídos no estudo. A infecção por *L.infantum* foi confirmada por eletroforese de enzimas multilocus (MLEE) em todas as cepas isoladas pelo Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz (TRNTL/IOC). Anteriormente à eutanásia, os animais foram submetidos a avaliação clínica por dois veterinários e seis sinais clínicos característicos de leishmaniose visceral canina foram avaliados: dermatite, onicogrifose, alterações oftálmicas, perda de condição corporal, alopecia e linfadenopatia. A condição corporal será classificada como 0 (Ideal: costelas facilmente palpáveis com pouca gordura, cintura facilmente vista de cima e silhueta abdominal evidente), 1 (Magro: costelas facilmente palpáveis podendo ser visíveis, sem gordura palpável, o topo da região lombar é visível, ossos pélvicos proeminentes, silhueta da cintura e abdômen aparentes), 2 (Muito magro: Costelas, ossos lombares e pélvicos são facilmente visíveis, ausência de gordura palpável, evidência de outras proeminências ósseas e perda muscular mínima) e 3 (Extremamente magro: todas as estruturas ósseas são proeminentes e evidenciadas à distância, sem gordura corporal perceptível e perda severa de massa muscular). Cada sinal clínico foi avaliado de acordo com sua intensidade em uma escala de 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) a 3 (grave) pontos segundo Quinnell *et al.* (2001). A soma dos pontos obtidos por cada animal determinou seu respectivo escore clínico, podendo o animal ter baixo (0 a 2), médio (3 a 6) e alto escore clínico (7 a 18). Os animais selecionados foram divididos em dois grupos: grupo 1 – 13 animais assintomáticos (escore clínico = 0) e grupo 2 – 13 animais sintomáticos com alto escore clínico (escore clínico >7).

3.3 Análise histopatológica

Vinte e seis amostras de pele de orelha e vinte e seis amostras de pele de abdômen foram coletadas durante a necrópsia, fixadas em formalina tamponada 10%, emblocadas em parafina, cortadas com espessura de 5µm e montadas em lâminas de vidro para posterior análise histopatológica. As amostras foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica (Nikon Eclipse E400 - Tokyo, Japão). O infiltrado inflamatório foi analisado de acordo com sua distribuição (perivascular ou difuso) e sua intensidade (ausente a leve e moderado a intenso) e a presença ou ausência de reações granulomatosas. O colágeno dérmico foi analisado em tecidos corados com Picrosirius Red. Foi realizada uma análise qualitativa para avaliar a quantidade de colágeno presente na derme. Dessa forma, a quantidade de colágeno observada foi classificada em: 1-Colágeno regular: para fragmentos que apresentaram ausência ou leve alterações em fibras de colágeno e 2 – Pouco colágeno: para fragmentos que apresentaram moderada ou intensa alterações em fibras de colágeno

3.4 Imunohistoquímica

As amostras de pele emblocadas em parafina foram cortadas com espessura de 5µm e montadas em lâminas silanizadas (slides silanizados, DakoCytomation, Carpinteria, CA, U.S.A.). As amostras foram desparafinizadas de acordo com o protocolo do laboratório e posteriormente hidratadas com água destilada. Foi realizado o bloqueio de peroxidase endógena (reagente bloqueador de peroxidase, Dako), recuperação antigênica utilizando Citrato pH 6,0 e o bloqueio das marcações inespecífica (BSA a 0,4%, Sigma, E.U.A.). As amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-*L.infantum* para posterior análise da carga parasitária. O número e diâmetro dos vasos sanguíneos dérmicos também foram avaliados nessas amostras para análise da associação entre os vasos sanguíneos e a localização de amastigotas. O diâmetro vascular e o número de vasos foram quantificados por campo microscópico utilizando software ImageJ 1.48v (NIH, EUA). A contagem de amastigotas foi realizada através de imunohistoquímica com marcação para *L. infantum*. 20 campos (aumento 1000x) por amostra foram aleatoriamente selecionados para realizar a contagem. O número e diâmetro dos vasos sanguíneos foram avaliados de acordo com a morfologia do vaso (aumento 40x).

3.5 Análise estatística

O software Prism (Graphpad Prism® versão 6.01) foi utilizado para a realização das análises estatísticas. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney para variáveis independentes com distribuição não paramétrica. A análise comparativa entre os fragmentos de pele de orelha e abdômen foram analisados pelo teste Wilcoxon. As correlações foram determinadas utilizando o Coeficiente de correlação de Pearson ou o coeficiente de correlação de Spearman dependendo da normalidade das variáveis. As variáveis qualitativas foram analisadas por tabelas de contingência utilizando Fisher's exact test. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Onicogrifose e dermatite foram os sinais clínicos observados com maior intensidade e maior frequência em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Vinte e seis cães foram selecionados para a realização desse estudo, dentre eles, 13 foram considerados assintomáticos e 13 foram considerados sintomáticos. Os animais foram submetidos a uma avaliação clínica com análise dos seguintes sinais clínicos característicos de LVC: dermatite, onicogrifose, alterações oftálmicas, perda de condição corporal, alopecia e linfadenopatia. Os sinais clínicos de cães que apresentaram sintomatologia clínica foram pontuados de acordo com a intensidade em: leve, moderado e grave. A soma das pontuações de acordo com a intensidade, caracterizou o escore clínico de cada animal, o qual pode ser observado na tabela 4.0. Dentre os sinais clínicos avaliados, a onicogrifose e a dermatite foram observados em maior intensidade (Figura 4.0), além de serem observados em maior frequência, 13 e 12 animais respectivamente (Figura 4.0). Os sinais clínicos dermatológicos também foram avaliados e a dermatite foi observada com maior frequência seguida por alopecia e descamação (tabela 4.0).

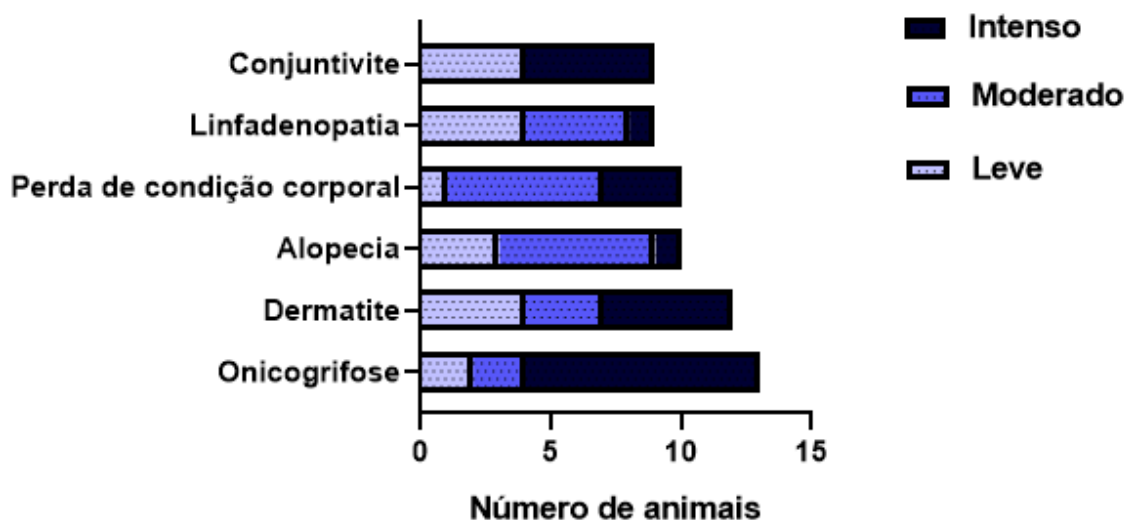


Figura 4.0 – Intensidade de sinais clínicos apresentados por 13 cães sintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

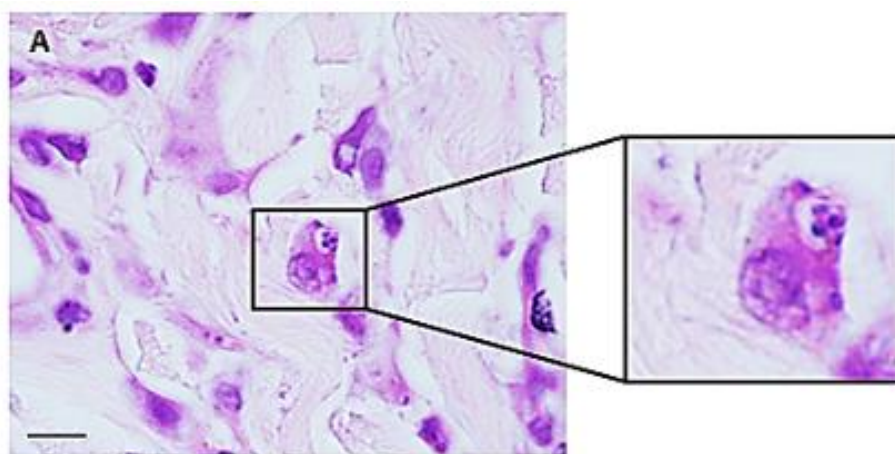
Tabela 4.0 - Sinais clínicos gerais, dermatológicos e pontuação por escore dos sinais clínicos observados em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (QUINNELL, 2001 modificado)

Número do animal	Sinais clínicos gerais	Sinais clínicos dermatológicos	Escore clínico
LPL 105/09	Linfadenomegalia (+) perda de condição corporal (+++)	Alopecia (++) onicogribose (+++)	9
LPL 113/09	Perda de condição corporal (++) Linfadenomegalia (++)	Alopecia (++) dermatite (+) onicogribose (+) descamação	8
LPL 124/09	Alterações oftálmicas (+++)	Alopecia (+++) dermatite (+++) onicogribose (+++) descamação.	12
LPL 127/09	Perda de condição corporal (++)	Alopecia (++) onicogribose (+++) dermatite (+++) descamação.	10
LPL 241/10	Linfadenomegalia (+) perda de condição corporal (++) Alterações oftálmicas (+++)	Dermatite (+) onicogribose (+++)	10
LPL 243/10	Perda de condição corporal (+++)	Alopecia (+) dermatite (+) onicogribose (+++) descamação	8
LPL 253/10	Perda de condição corporal (+) Linfadenomegalia (+) Alterações oftálmicas (+++)	Alopecia (+) dermatite (+++) onicogribose (++) descamação	11
LPL 254/10	Alterações oftálmicas (+) Perda de condição corporal (++)	Dermatite (++) onicogribose (+++) descamação e úlceras crostosas	8
LPL 255/10	Alterações oftálmicas (+) Linfadenomegalia (+) Perda de condição corporal (++)	Alopecia (++) dermatite (+++) Onicogribose (+) descamação e úlceras crostosas	10
LPL 259/10	Perda de condição corporal (++) Linfadenomegalia (++) Alterações oftálmicas (+++)	Alopecia (++) dermatite (++) Onicogribose (+++) descamação	14
LPL 261/10	Alterações oftálmicas (+) Linfadenomegalia(+++)	Alopecia (++) dermatite (+++) Onicogribose (++) descamação	11
LPL 262/10	Alterações oftálmicas (+) Linfadenomegalia (++) Perda de condição corporal (+++)	Alopecia (+) dermatite (++) Onicogribose (+++) descamação	12
LPL 265/10	Dermatite (+) Linfadenomegalia (++) Alterações oftálmicas (+++)	Dermatite (+) Onicogribose (+++) descamação	9

+ leve, ++ moderado, +++ grave

4.2 Cães naturalmente infectados por *L. infantum*, apresentam maior intensidade de infiltrado inflamatório em pele de orelha.

A análise histopatológica da pele foi realizada através de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Foi avaliado o grau do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen de acordo com a sintomatologia clínica, classificando em: 1- Ausente a leve; 2- moderado a intenso (Figura 4.1). Em cães assintomáticos, a pele da orelha de 10 animais apresentou infiltrado inflamatório com intensidade variando de ausente a leve, enquanto 3 animais apresentaram infiltrado variando de moderado a intenso. Em pele de abdômen nenhum animal apresentou infiltrado inflamatório variando de moderado a intenso, indicando que em animais sem sintomatologia clínica, o infiltrado é apresentado de forma mais branda principalmente em fragmentos de pele abdominais (Tabela 4.1). Em animais sintomáticos, somente 1 animal apresentou infiltrado inflamatório com variação de ausente a leve em pele de orelha. No entanto, em pele de abdômen, 7 animais apresentaram infiltrado variando de ausente a leve e 6 animais apresentaram infiltrado variando de moderado a intenso (Tabela 4.2). Analisando a intensidade do infiltrado inflamatório entre os grupos, a pele da orelha apresenta maior intensidade de infiltrado inflamatório em comparação com a pele de abdômen independente da sintomatologia clínica (Fisher's exact test, P value = *0,022) (Figura 4.2). Analisando separadamente de acordo com a sintomatologia clínica, foi possível observar significância estatística entre os dados somente em cães sintomáticos (Fisher's exact test, P value = *0,030) (Figura 4.3B). Realizando uma análise comparativa entre os fragmentos de pele de orelha e abdômen de acordo com a sintomatologia clínica, a pele de orelha de cães sintomáticos apresentou maior intensidade de infiltrado inflamatório (Fisher's exact test, P value = **0,0010) (Figura 4.4A), enquanto em pele de abdômen, cães sem sintomatologia clínica, apresentaram infiltrado inflamatório de forma mais branda (Fisher's exact test, P value = *0,014) (Figura 4.4B).



Assintomático

Sintomático

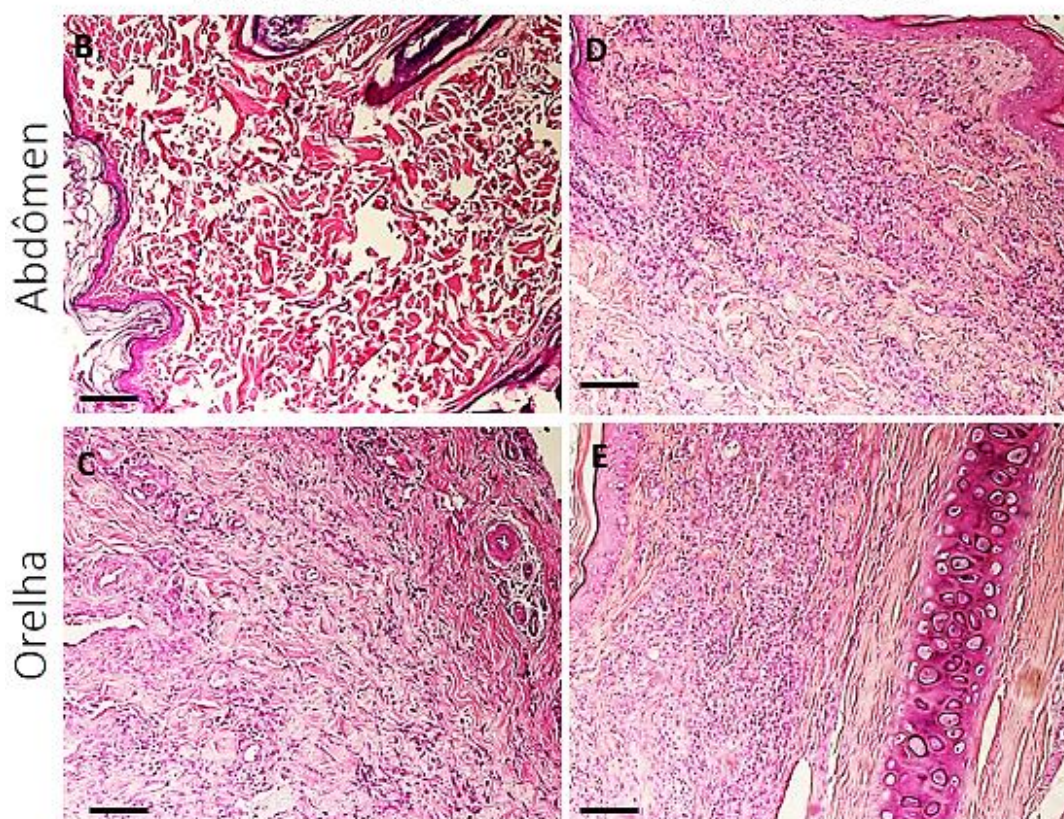


Figura 4.1 - Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de fragmentos de pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Amastigotas parasitando macrófago. Figura B: Pele de abdômen de cão assintomático com ausência de infiltrado inflamatório. Figura C: Pele de orelha do mesmo cão da figura B apresentando infiltrado inflamatório moderado. Figura D: Pele de abdômen de cão sintomático apresentando infiltrado inflamatório moderado. Figura E: Pele de orelha do mesmo cão da figura D apresentando infiltrado inflamatório intenso.

Tabela 4.1 - Intensidade de infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen de cães assintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*.

Infiltrado inflamatório	Fragmento de pele analisado	
	Pele de orelha	Pele de abdômen
Ausente a leve	10	13
Moderado a intenso	3	0

Fisher's exact test, P value = 0,220

Tabela 4.2 - Intensidade de infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen de cães sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*.

Infiltrado inflamatório	Fragmento de pele analisado	
	Pele de orelha	Pele de abdômen
<i>Ausente a leve</i>	1	7
<i>Moderado a intenso</i>	12	6

Fisher's exact test, P value = *0,030

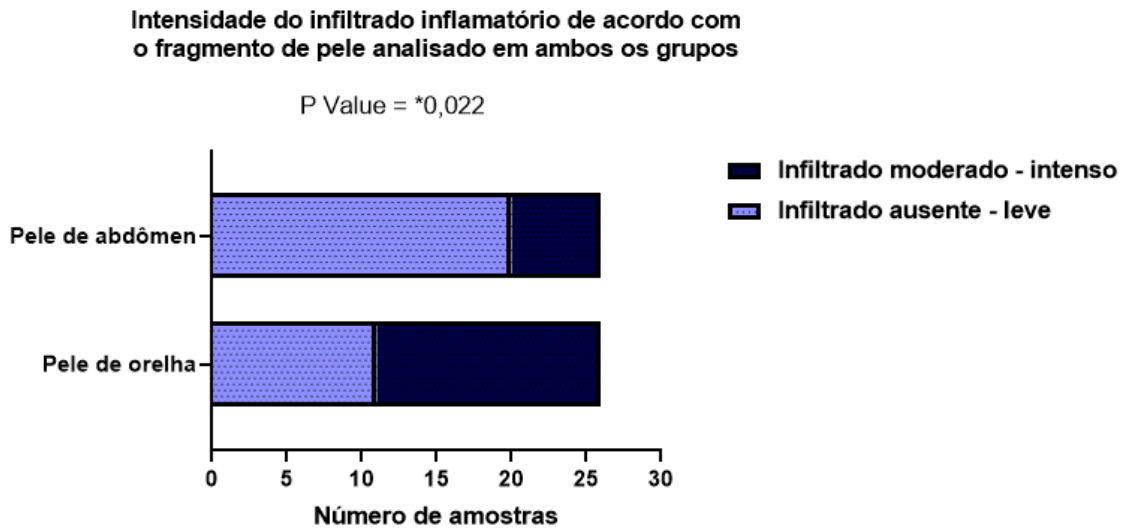
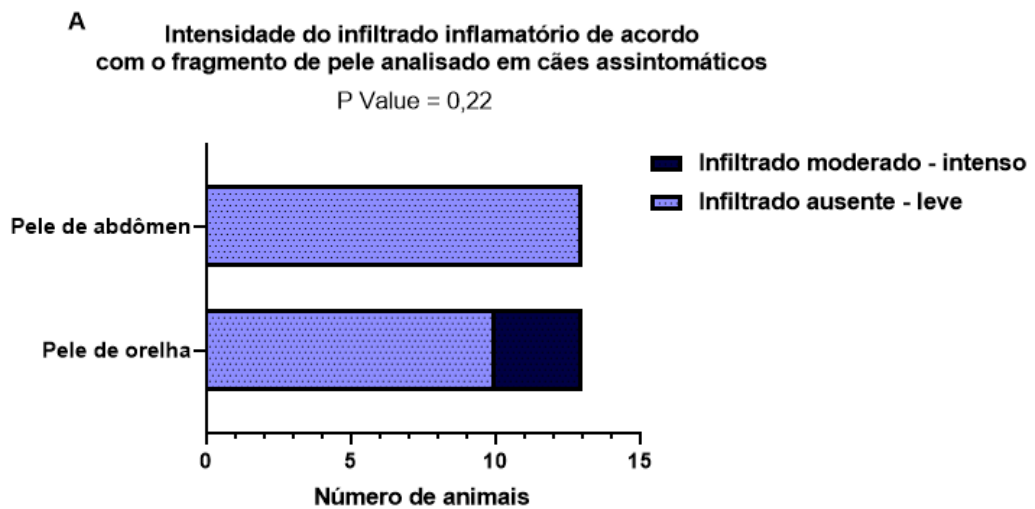


Figura 4.2 - Frequência de fragmentos de orelha e abdômen analisados de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L.infantum*.



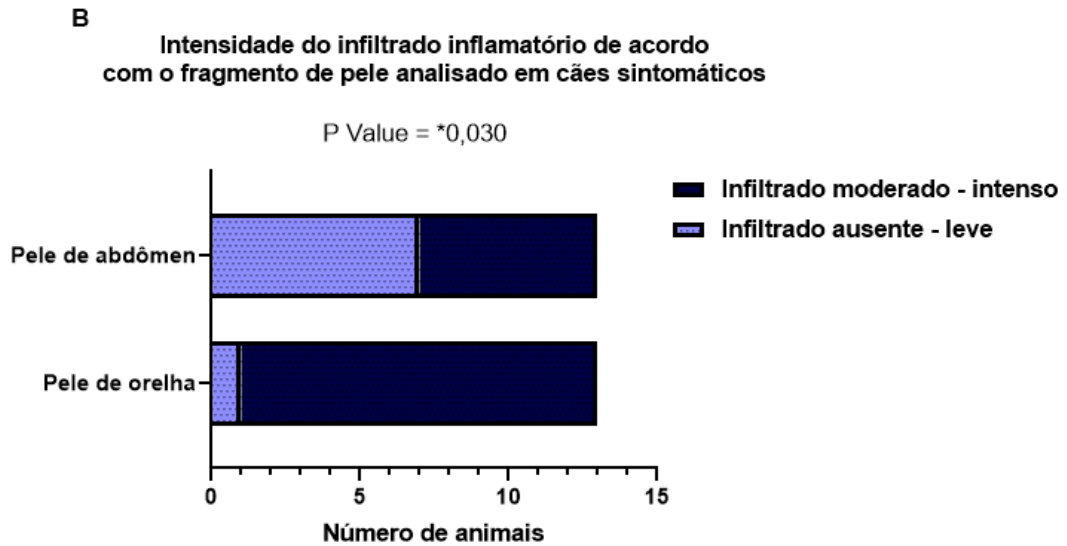


Figura 4.3 - Frequência de animais de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen. Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos.

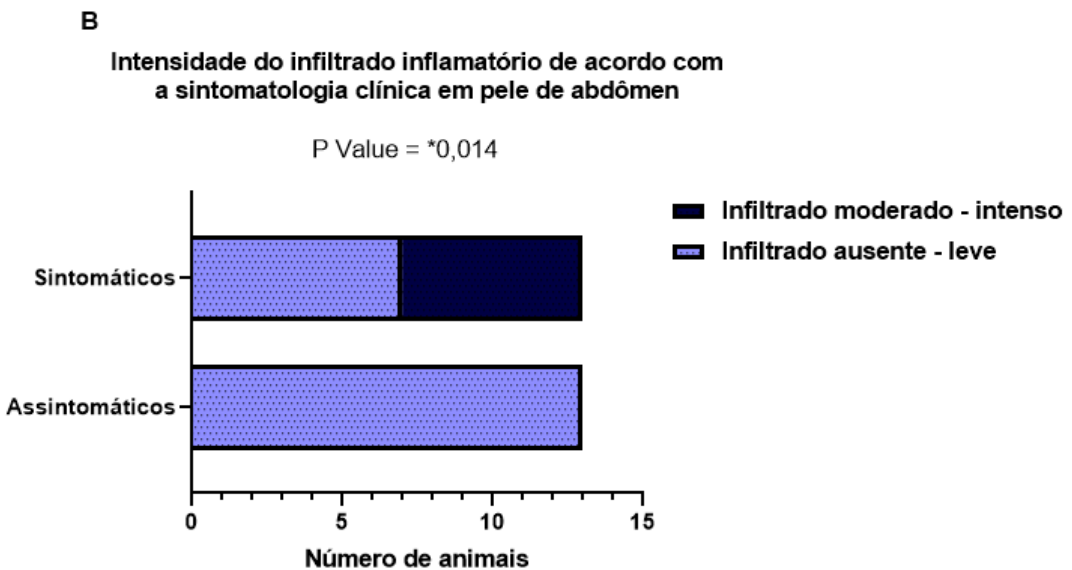
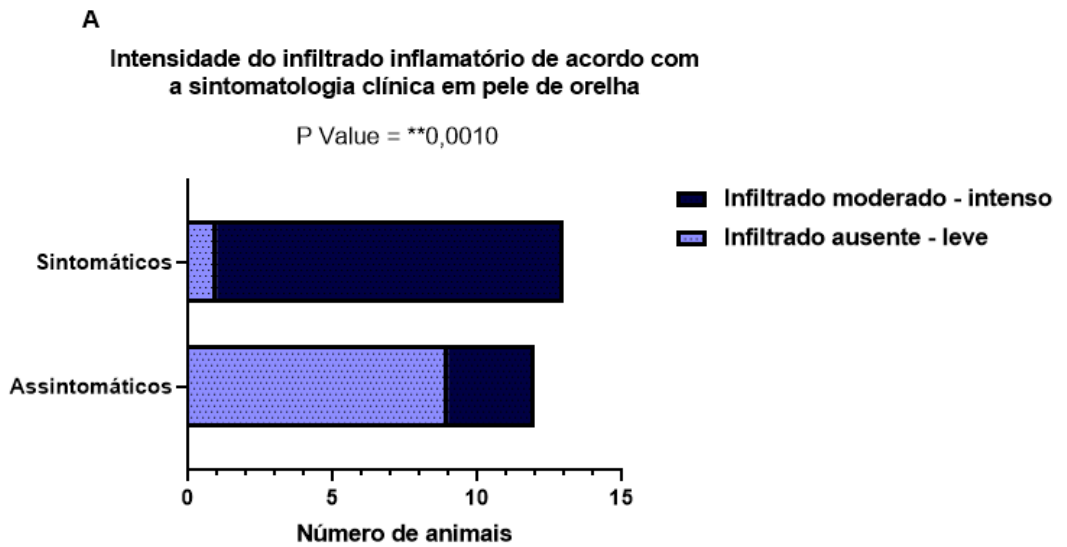


Figura 4.4 - Frequência de animais de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório e sintomatologia clínica. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen.

Foi possível observar amastigotas parasitando o citoplasma de células presentes no infiltrado inflamatório (Figura 4.1A).

4.3 Animais sintomáticos apresentam infiltrado inflamatório acometendo regiões mais extensas na derme

Ao analisar a localização do infiltrado inflamatório, foi avaliado se o infiltrado se apresentava de forma difusa pela derme ou localizado principalmente em regiões perivasculares. Sendo assim, a distribuição do infiltrado inflamatório foi classificado em: 1- Difuso ou 2- Perivascular (Figura 4.5B-E). Animais com ausência de infiltrado inflamatório (Figura 4.5A) não fizeram parte desta análise. Ao avaliar animais assintomáticos, a pele da orelha de 7 animais apresentou infiltrado inflamatório localizado principalmente em regiões perivasculares, enquanto 3 animais apresentaram infiltrado distribuído de forma difusa. Ainda em pele de orelha, 1 animal não apresentou infiltrado inflamatório e 2 animais apresentaram infiltrado localizado na extremidade do tecido, portanto, não fizeram parte desta análise. Em pele de abdômen, nenhum animal apresentou infiltrado inflamatório distribuído de forma difusa pela derme e 3 animais apresentaram infiltrado localizado em regiões perivasculares (Tabela 4.3). Ainda em pele de abdômen, 9 animais não apresentaram infiltrado inflamatório e 1 animal apresentou infiltrado localizado na extremidade do tecido, portanto, não fizeram parte dessa análise. Em animais sintomáticos, somente 1 animal apresentou infiltrado localizado principalmente em regiões perivasculares em pele de orelha e 10 animais apresentaram infiltrado distribuído de forma difusa pela derme. Ainda em pele de orelha, 2 animais apresentaram infiltrado localizado na extremidade do tecido, portanto, não fizeram parte dessa análise. Em pele de abdômen, 3 animais apresentaram infiltrado localizado principalmente ao redor dos vasos sanguíneos e 7 animais apresentaram infiltrado distribuído de forma difusa (Tabela 4.4). Ainda em pele de Abdômen, 3 animais apresentaram infiltrado localizado na extremidade do tecido, portanto, não fizeram parte desta análise. Os dados indicam que cães sintomáticos apresentam infiltrado inflamatório distribuído de forma mais difusa pela derme, principalmente em pele de orelha. Analisando a distribuição do infiltrado inflamatório entre os grupos, não foi possível observar significância estatística entre os dados analisados (Figura 4.6 e 4.7). Realizando uma análise comparativa entre os fragmentos de pele de orelha e abdômen de acordo com a sintomatologia clínica, foi possível observar significância estatística somente

em pele de orelha. Assim, a pele de orelha de cães sintomáticos apresentou maior distribuição de infiltrado inflamatório (Fisher's exact test, P value = **0,0075) (Figua 4.8A).

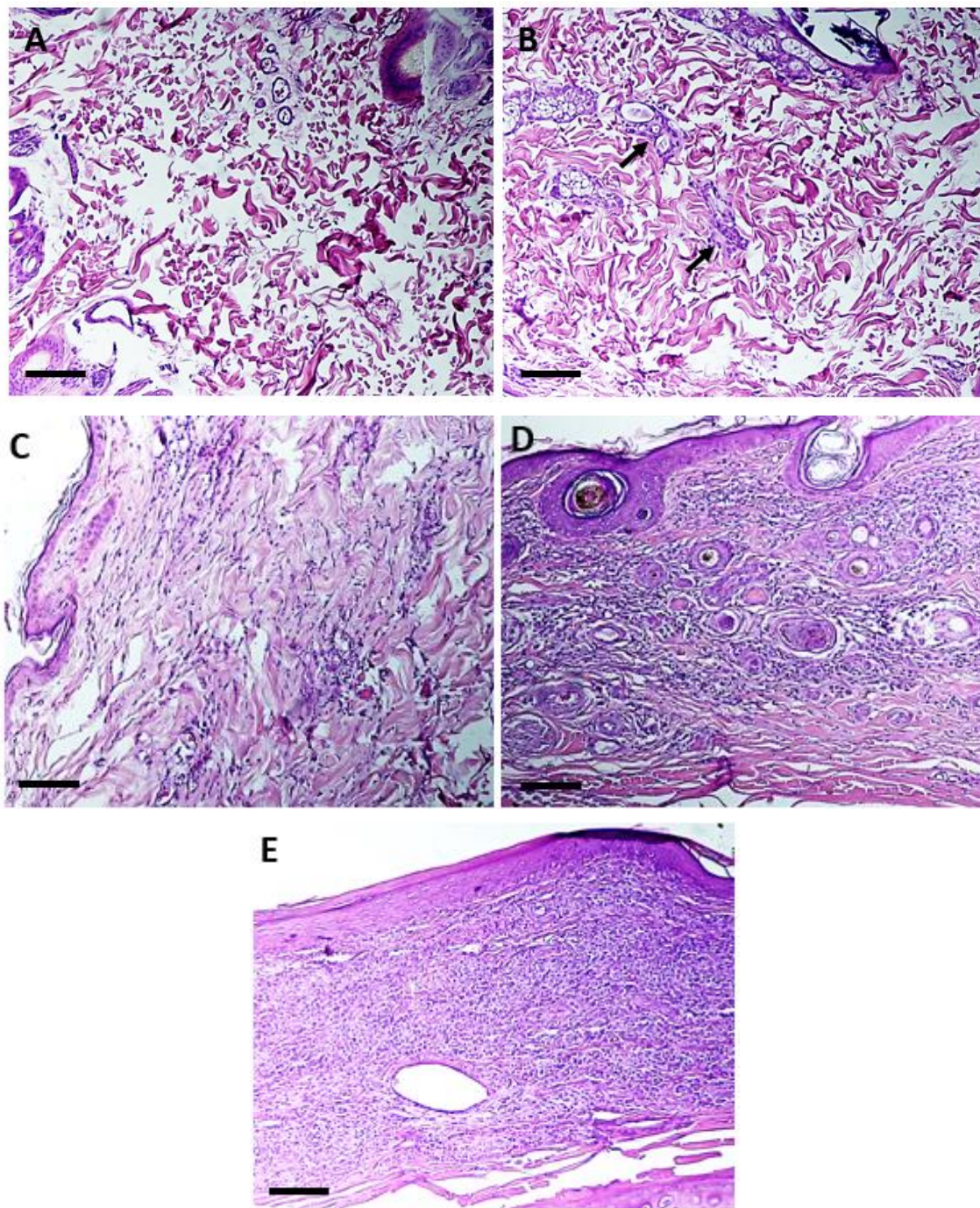


Figura 4.5 - Fotomicrografias de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentando ausência e distribuição do infiltrado inflamatório: Figura A: Infiltrado ausente. Figura B: Infiltrado prerivascular. Figura C: Infiltrado leve e difuso. Figura D: Infiltrado moderado e difuso. Figura E: Infiltrado intenso e difuso.

Tabela 4.3 - Distribuição do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen de cães assintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*.

Infiltrado inflamatório	Fragmento de pele analisado	
	Pele de orelha	Pele de abdômen
<i>Perivascular</i>	7	3
<i>Difuso</i>	3	0

Fisher's exact test, P value = 0,52

Tabela 4.4 - Distribuição do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen de cães sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*.

Infiltrado inflamatório	Fragmento de pele analisado	
	Pele de orelha	Pele de abdômen
<i>Perivascular</i>	1	3
<i>Difuso</i>	10	7

Fisher's exact test, P value = 0,31

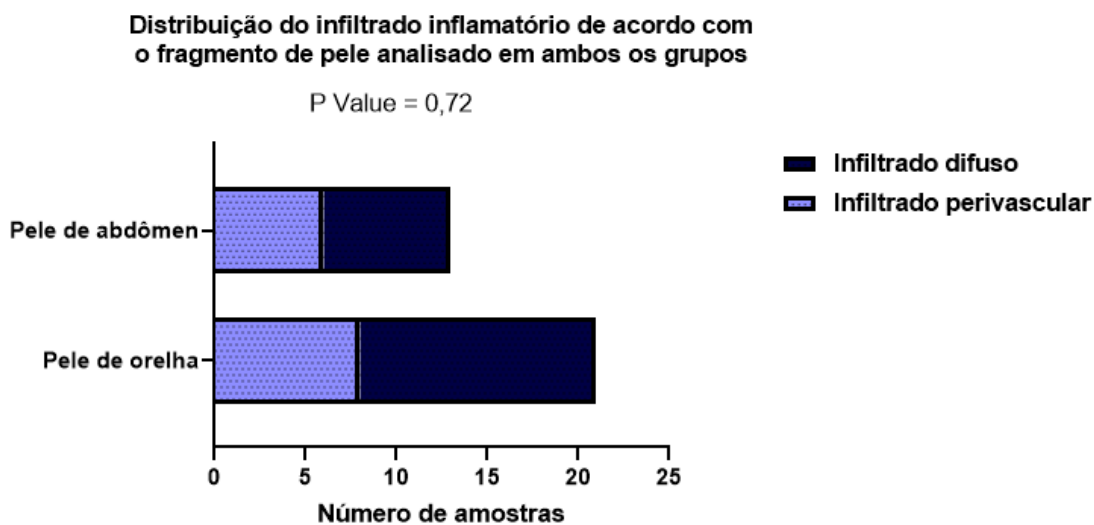


Figura 4.6 - Frequência de fragmentos de orelha e abdômen analisados de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório em cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*

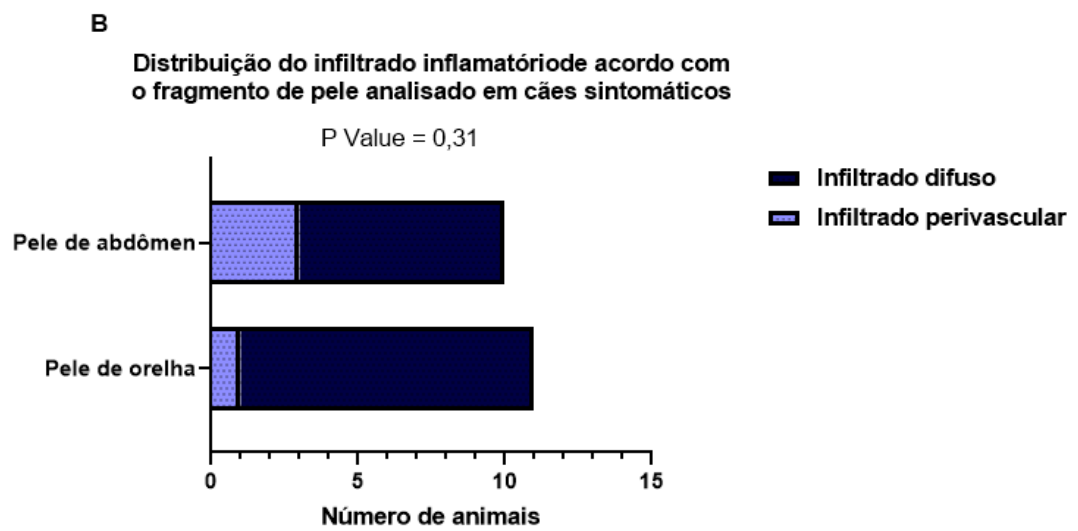
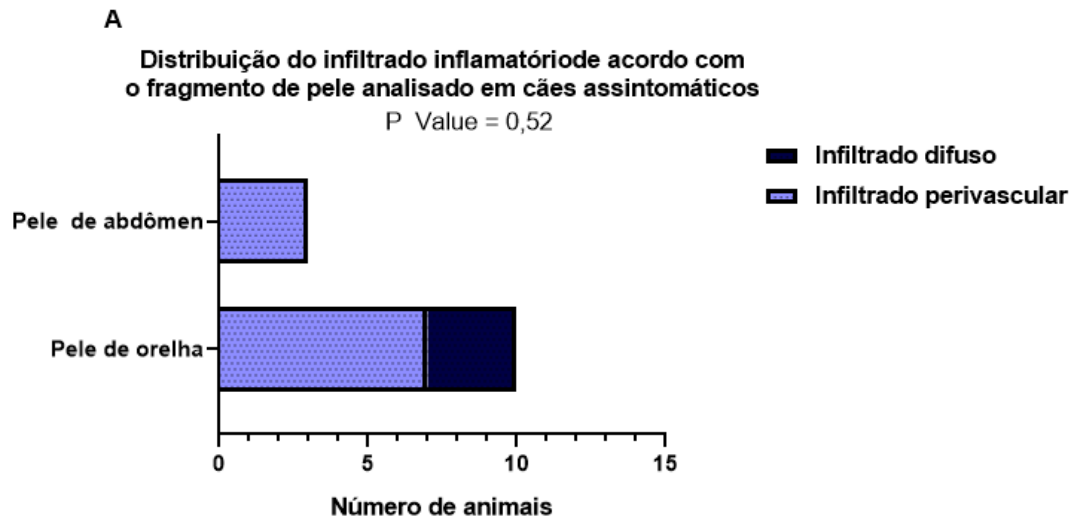
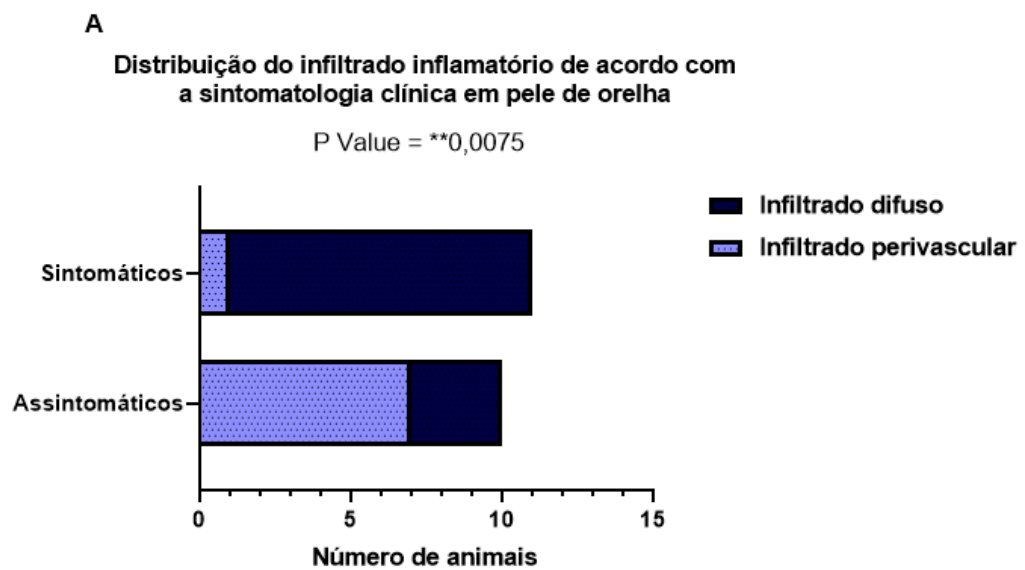


Figura 4.7 - --Frequência de animais de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen. Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos



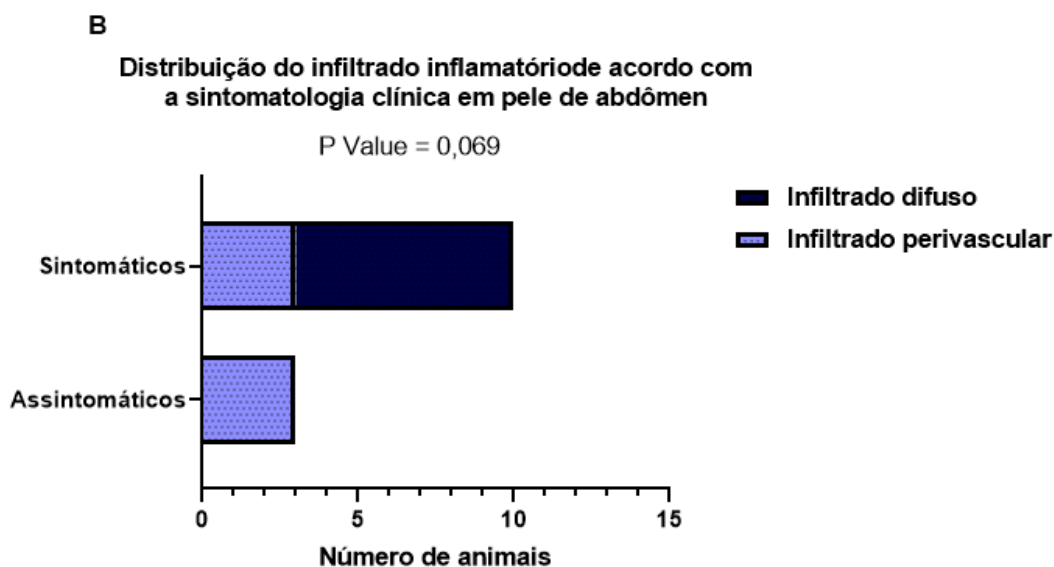


Figura 4.8 - Frequência de animais de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório e sintomatologia clínica. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen.

4.4 Animais sintomáticos apresentam maior frequência de reação granulomatosa

Foi avaliada a presença de reação granulomatosa (Figura 4.9) em pele de orelha e abdômen de cães assintomáticos e sintomáticos. Em animais sem sintomatologia clínica, somente 2 cães apresentaram reação granulomatosa em pele de orelha, enquanto em pele de abdômen, nenhum animal apresentou presença de reação granulomatosa. Em cães com sintomatologia clínica, 8 animais apresentaram reação granulomatosa em pele de orelha, enquanto em pele de abdômen 6 cães apresentaram reação granulomatosa. Os dados indicam que animais sintomáticos apresentam reação granulomatosa com mais frequência em relação a animais assintomáticos (Fisher's exact test, P value = ***0,0006) (Figura 4.10). Analisando individualmente os fragmentos de pele de orelha e abdômen, foi possível observar maior frequência de reação granulomatosa em fragmentos de pele de orelha de animais sintomáticos (Fisher's exact test, P value = *0,041) (Figura 4.11A). Em pele de abdômen, nenhum cão assintomático apresentou reação granulomatosa (Fisher's exact test, P value = *0,014) (Figura 4.11B).

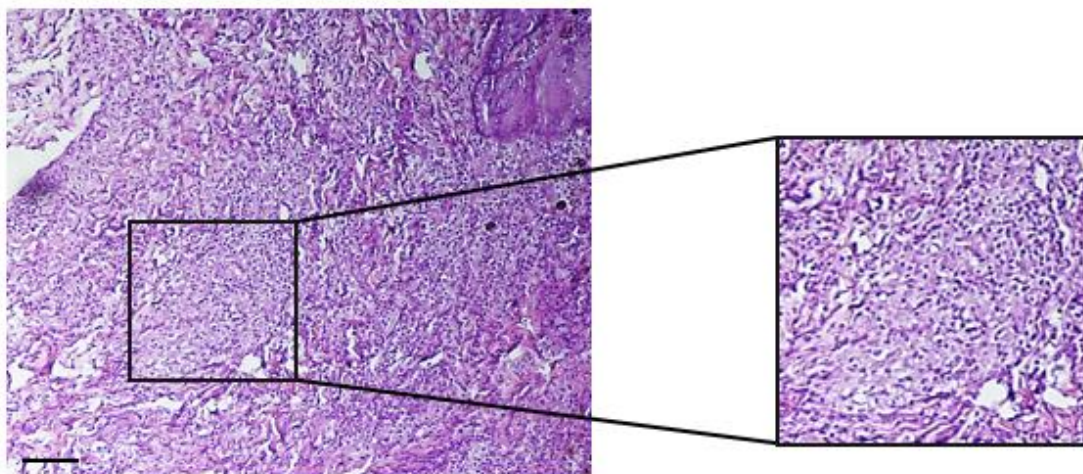


Figura 4.9 - Fotomicrografia da pele de orelha de cão sintomático apresentando infiltrado inflamatório intenso e difuso com a presença de reação granulomatosa.

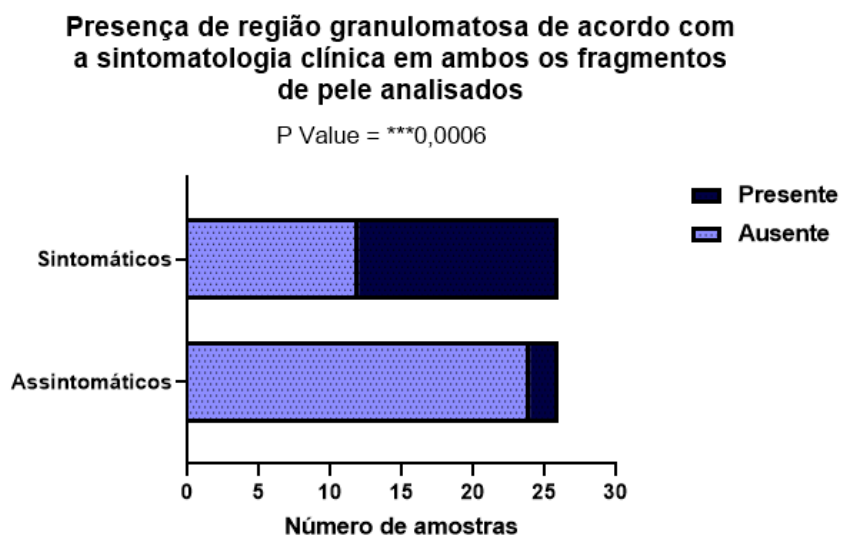
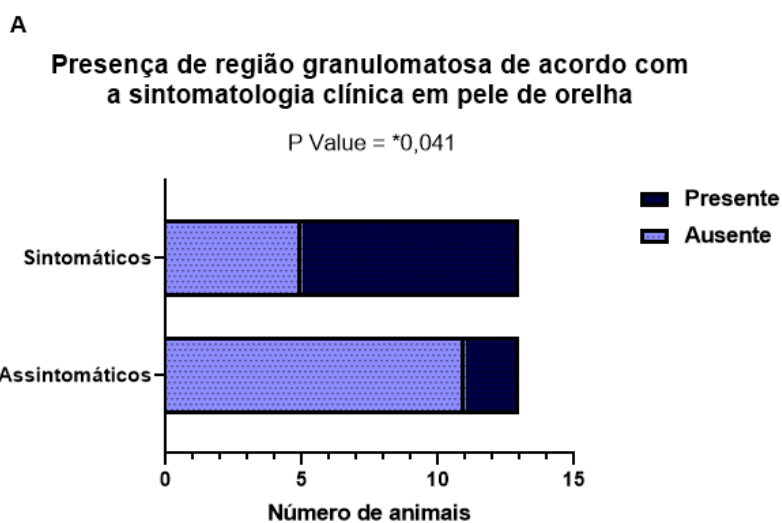


Figura 4.10 - Frequência de fragmentos de orelha e abdômen analisados de acordo com a presença de reação granulomatosa em cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L.infantum*



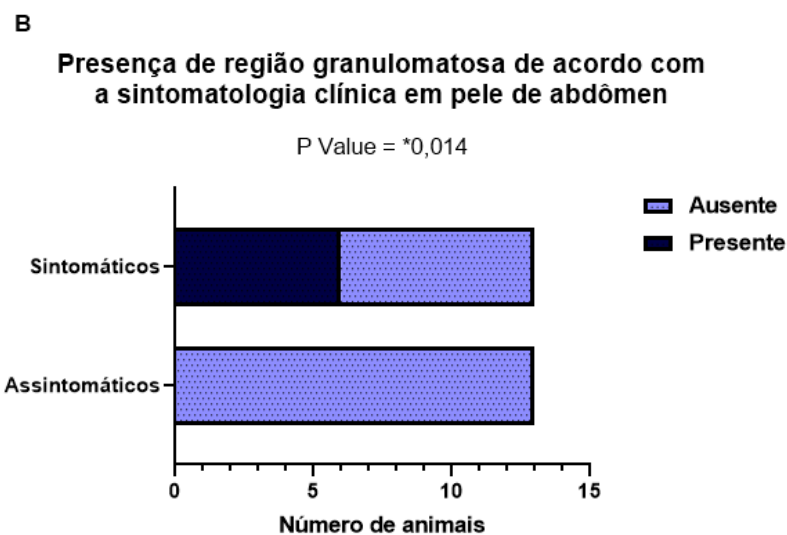


Figura 4.11 - Frequência de animais de acordo com a presença de regiões granulomatosas e sintomatologia clínica. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen

4.5 A presença de reação granulomatosa está associada à intensidade do infiltrado inflamatório

A partir de resultados anteriores e a observação de que animais com sintomatologia clínica apresentam reação granulomatosa em maior frequência, avaliamos se há associação entre tal parâmetro e a intensidade do infiltrado inflamatório. Analisando os fragmentos de pele de orelha e abdômen de ambos os grupos (sintomáticos e assintomáticos), foi observado maior presença de reação granulomatosa em fragmentos de pele que apresentaram maior intensidade de infiltrado inflamatório (Fisher's exact test. P Value = ****<0,0001) (Figura 4.12). Tais observações também foram estatisticamente significantes analisando os fragmentos de pele de orelha (Fisher's exact test. P Value = ***<0,0007) e Abdômen (Fisher's exact test. P Value = ****<0,0001) de forma isolada (Figura 4.13A e B).

Presença de região granulomatosa de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em ambos os grupos

P Value = ****<0,0001

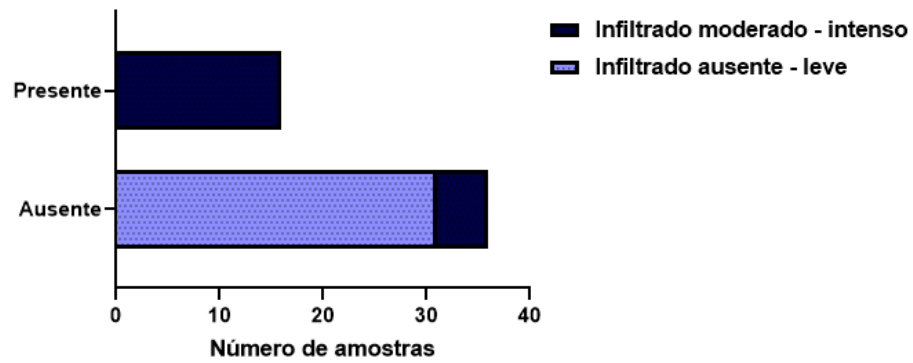
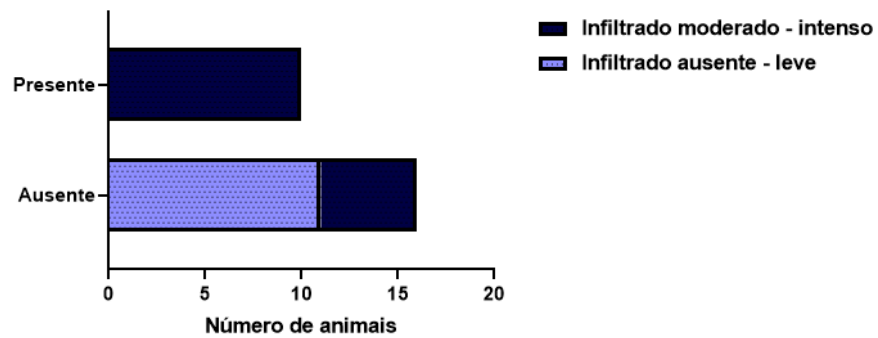


Figura 4.12 - Associação entre a presença de reação granulomatosa em cães naturalmente infectados por *L.infantum* de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório.

A

Presença de região granulomatosa de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de orelha

P Value = ***0,0007



B

Presença de região granulomatosa de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de abdômen

P Value = ****<0,0001

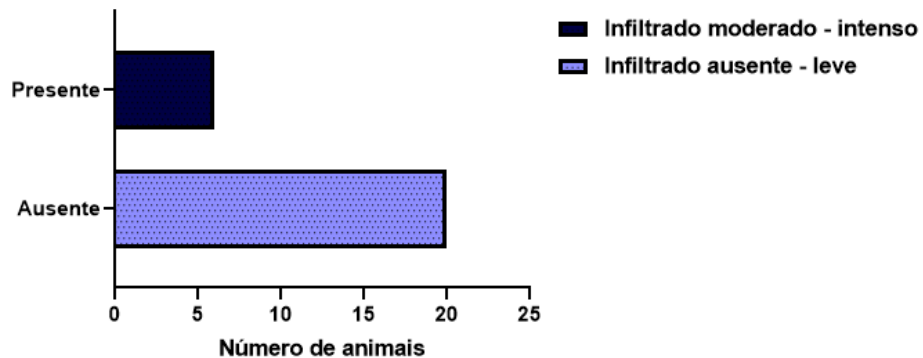


Figura 4.13 - Associação entre a presença de reação granulomatosa em cães naturalmente infectados por *L.infantum* de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. A: Pele de orelha B: Pele de abdômen.

4.6 A presença de reação granulomatosa está associada à distribuição do infiltrado inflamatório

Além da associação com a intensidade, foi avaliado se a presença de reação granulomatosa estava associada com a distribuição do infiltrado inflamatório. Analisando fragmentos de pele de orelha e abdômen de cães sintomáticos e assintomáticos, foi observada presença de reação granulomatosa somente em amostras que possuíam infiltrado inflamatório distribuído de forma difusa pela derme (Fisher's exact test. P Value = ****0,0044**) (Figura 4.14). Analisando individualmente fragmentos de pele de orelha e abdômen, ambos apresentaram reação granulomatosa somente em amostras que possuíam infiltrado inflamatório distribuído de forma difusa, mas somente em pele de orelha os dados foram significativos estatisticamente (Fisher's exact test. P Value = ***0,045**) (Figura 4.15A).

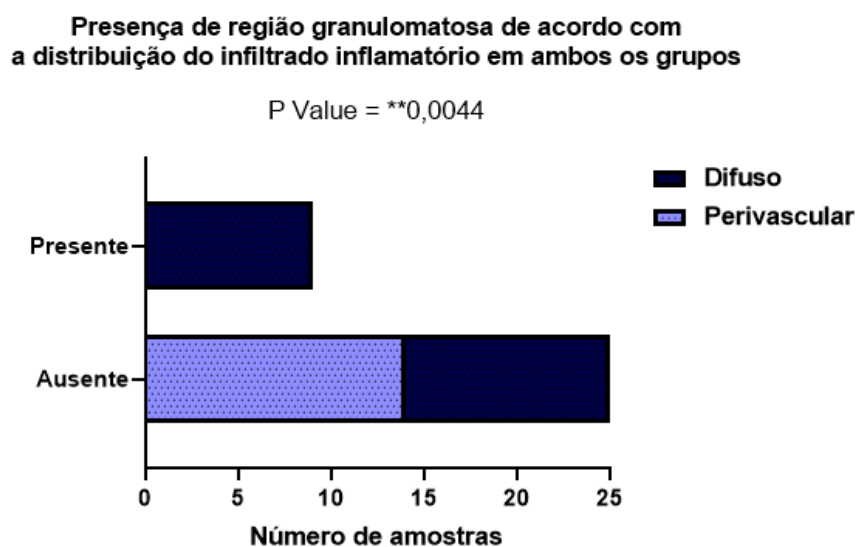


Figura 4.14 Associação entre a presença de reação granulomatosa em cães naturalmente infectados por *L.infantum* de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório.

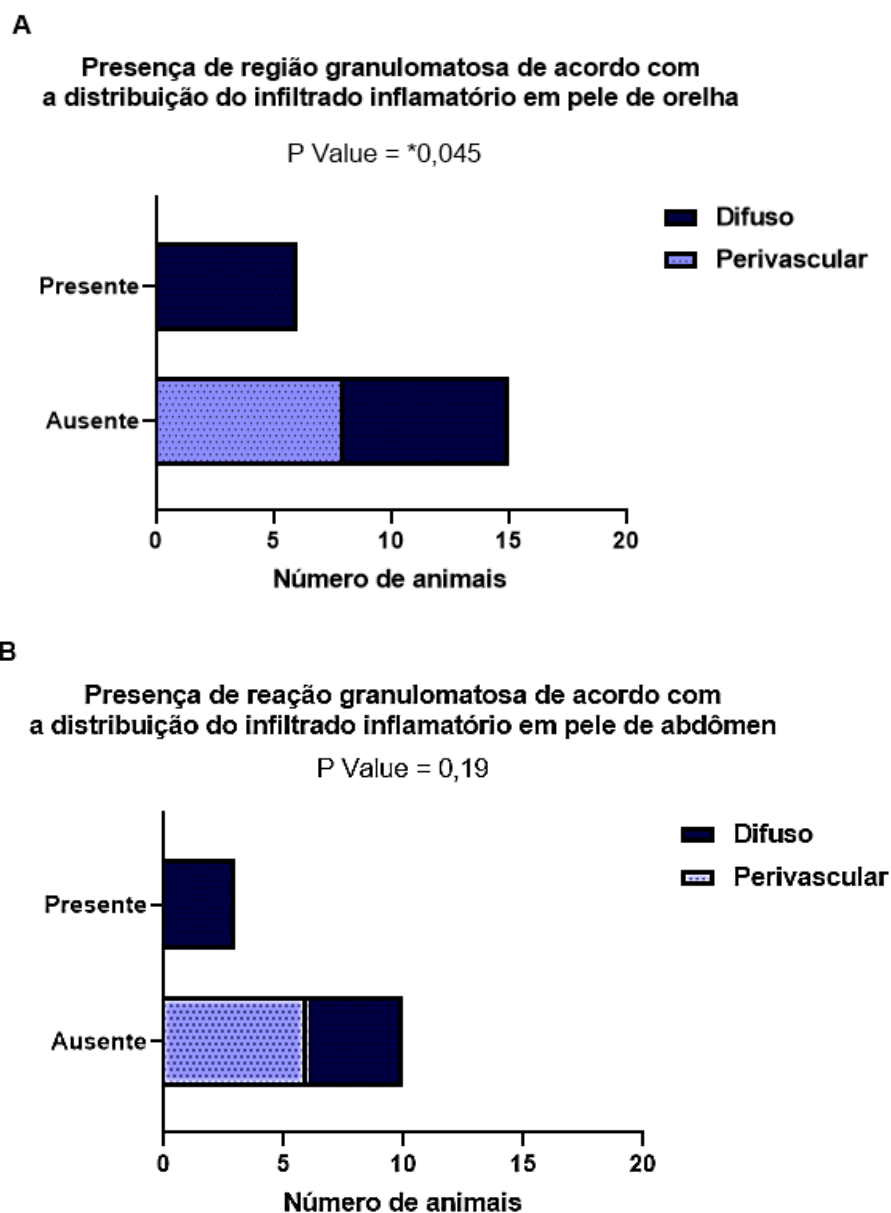


Figura 4.15 - Associação entre a presença de reação granulomatosa em cães naturalmente infectados por *L.infantum* de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen.

4.7 Número de amastigotas se mantém elevado em pele de orelha independente da progressão da doença

Ao avaliar frequência da carga parasitária em pele de orelha, foi possível observar a presença do parasito em todos os cães sintomáticos. Enquanto em cães sem sintomatologia clínica, oito animais apresentaram carga parasitária. Em pele de abdômen, doze cães sintomáticos apresentaram carga parasitária, enquanto em cães sem sintomatologia clínica, foi possível observar a presença do parasito em nove cães. Assim, cães com sintomatologia clínica, apresentaram maior frequência de carga parasitária. Ao analisar o número de amastigotas, não

foi possível observar diferenças estatisticamente significantes ao comparar a carga parasitária em pele de orelha e abdômen de ambos os grupos (Wilcoxon Test, P value = 0,50) (Figura 4.16). A pele da orelha de animais assintomáticos apresentou variação de 0 a 2,7 amastigotas por campo, enquanto em pele de abdômen foi observada variação de 0 a 0,7 amastigotas por campo (Wilcoxon Test, P value = 0,28) (Figura 4.17A). Em animais sintomáticos, a pele da orelha apresentou uma variação de 0,1 a 8,4 amastigotas por campo, enquanto em pele de abdômen, foi observada uma variação de 0 a 3,5 (Wilcoxon Test, P value = >0,99) (Figura 4.17B). A pele de orelha demonstrou maior número de amastigotas em comparação com a pele de abdômen, mas não foi possível observar significância estatística entre os dados avaliando individualmente de acordo com o fragmento de pele analisado.

Não houve diferenças entre número de amastigotas/campo em pele da orelha quando comparamos de acordo com a sintomatologia clínica (Figura 4.18A), no entanto houve uma tendência em ser mais elevada em pele de abdômen de cães sintomáticos (Mann-Whitney test P Value = 0,053) (Figura 4.18B). Os dados indicam que em pele de orelha, independente da progressão da doença, o número de amastigotas se mantém elevado. Este fato deve ser considerado no momento de realização do diagnóstico.

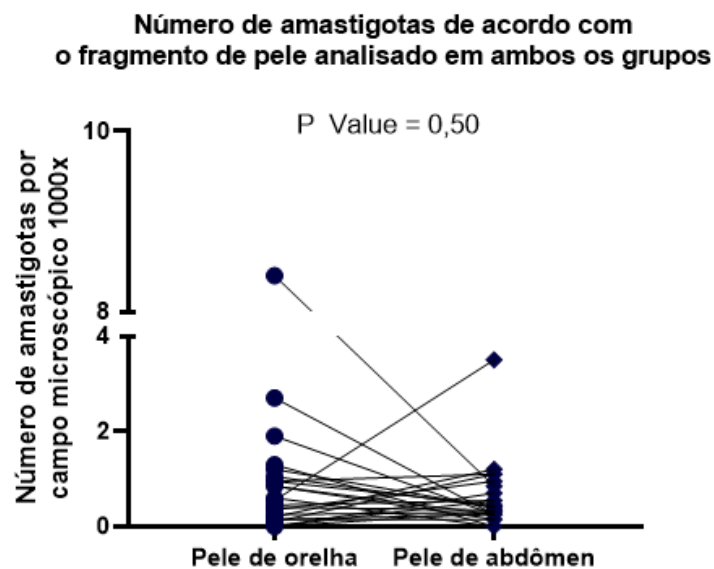
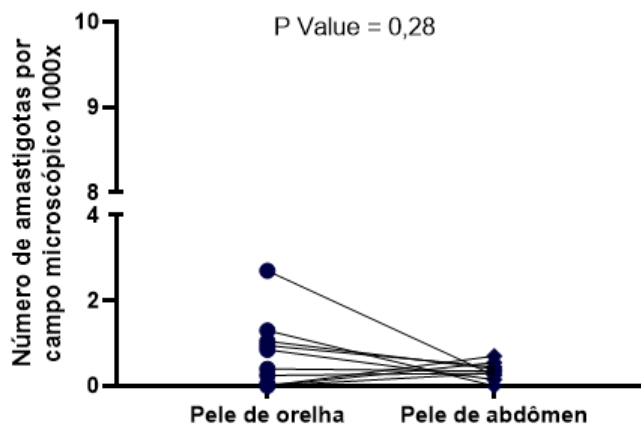


Figura 4.16 - Amastigotas por campo em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

A Número de amastigotas de acordo com o fragmento de pele analisado em cães assintomáticos



B Número de amastigotas de acordo com o fragmento de pele analisado em cães sintomáticos

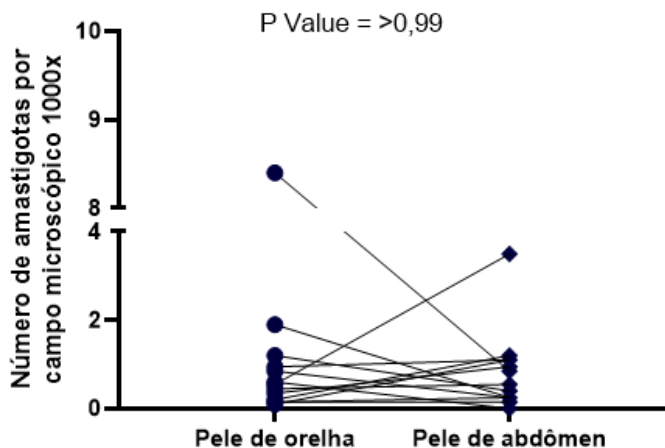
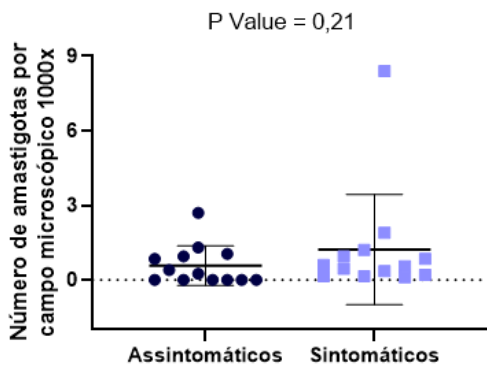


Figura 4.17 -Amastigotas por campo em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A: Cães assintomáticos. B: Cães sintomáticos.

A Número de amastigotas de acordo com a sintomatologia clínica em pele de orelha



B Número de amastigotas de acordo com a sintomatologia clínica em pele de abdômen

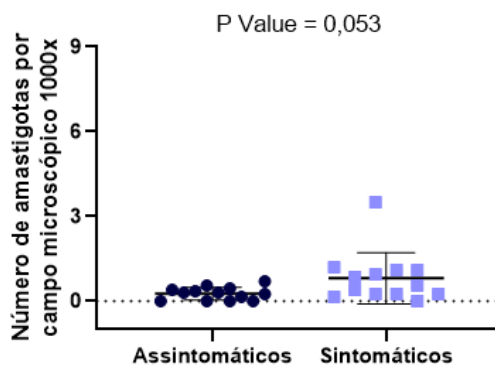
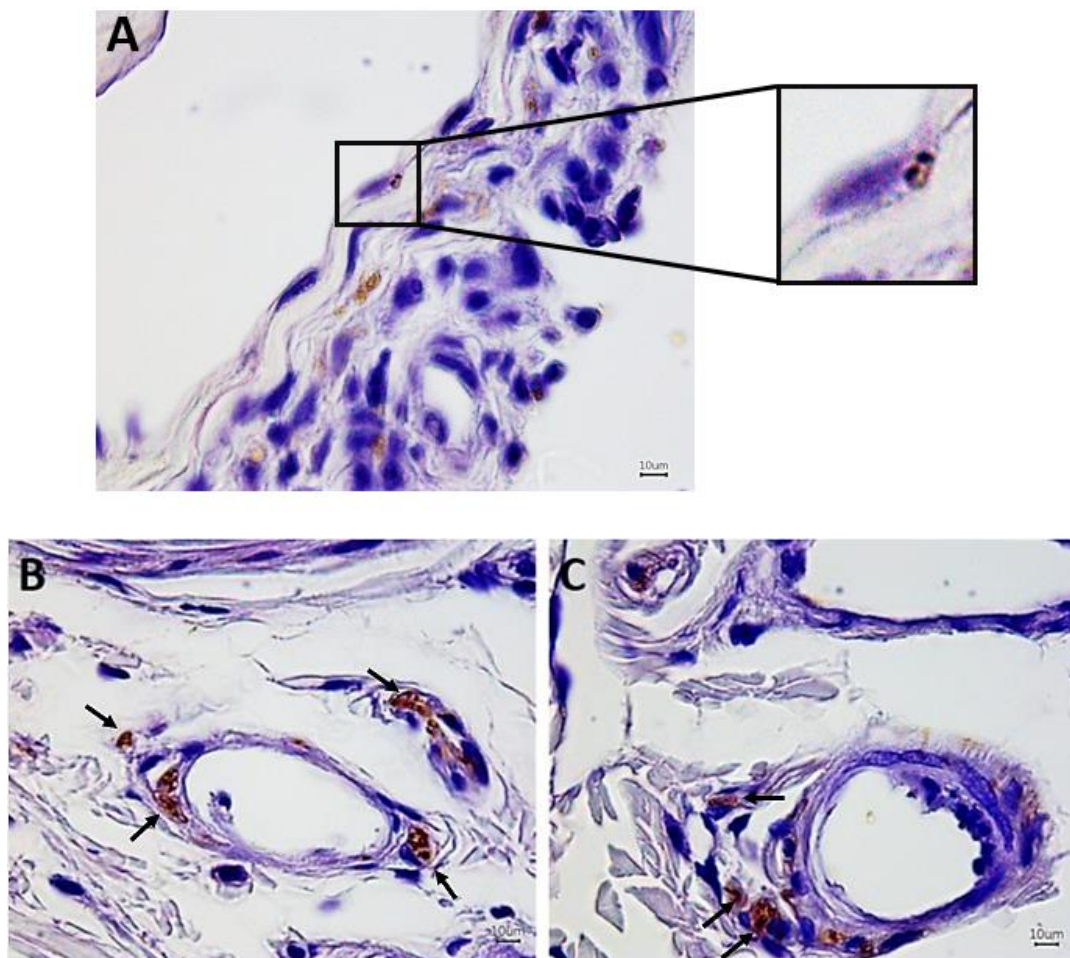


Figura 4.18 - Amastigotas por campo em fragmentos de pele de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*. A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen.

4.8 A distribuição de amastigotas está associada à intensidade do infiltrado inflamatório em pele de orelha e abdômen

Foi feita uma análise qualitativa de acordo com a localização de amastigotas presentes na derme. Foi possível observar amastigotas parasitando células endoteliais, subendoteliais e células ao redor dos vasos sanguíneos (Figura 4.19A-E), localizadas dentro dos vasos sanguíneos (Figura 4.19F e G) e distribuídas de forma difusa pelo tecido (Figura 4.19H-I). Portanto, a distribuição de amastigotas foi classificada em: perivascular para animais que possuíam um maior número de amastigotas ao redor dos vasos sanguíneos ou difusa para animais que possuíam um maior número de amastigotas distribuídas de forma difusa pela derme. Em vasos vistos longitudinalmente, podemos observar a presença do parasito ou de antígenos de amastigotas em sua extensão (Figura 4.20).



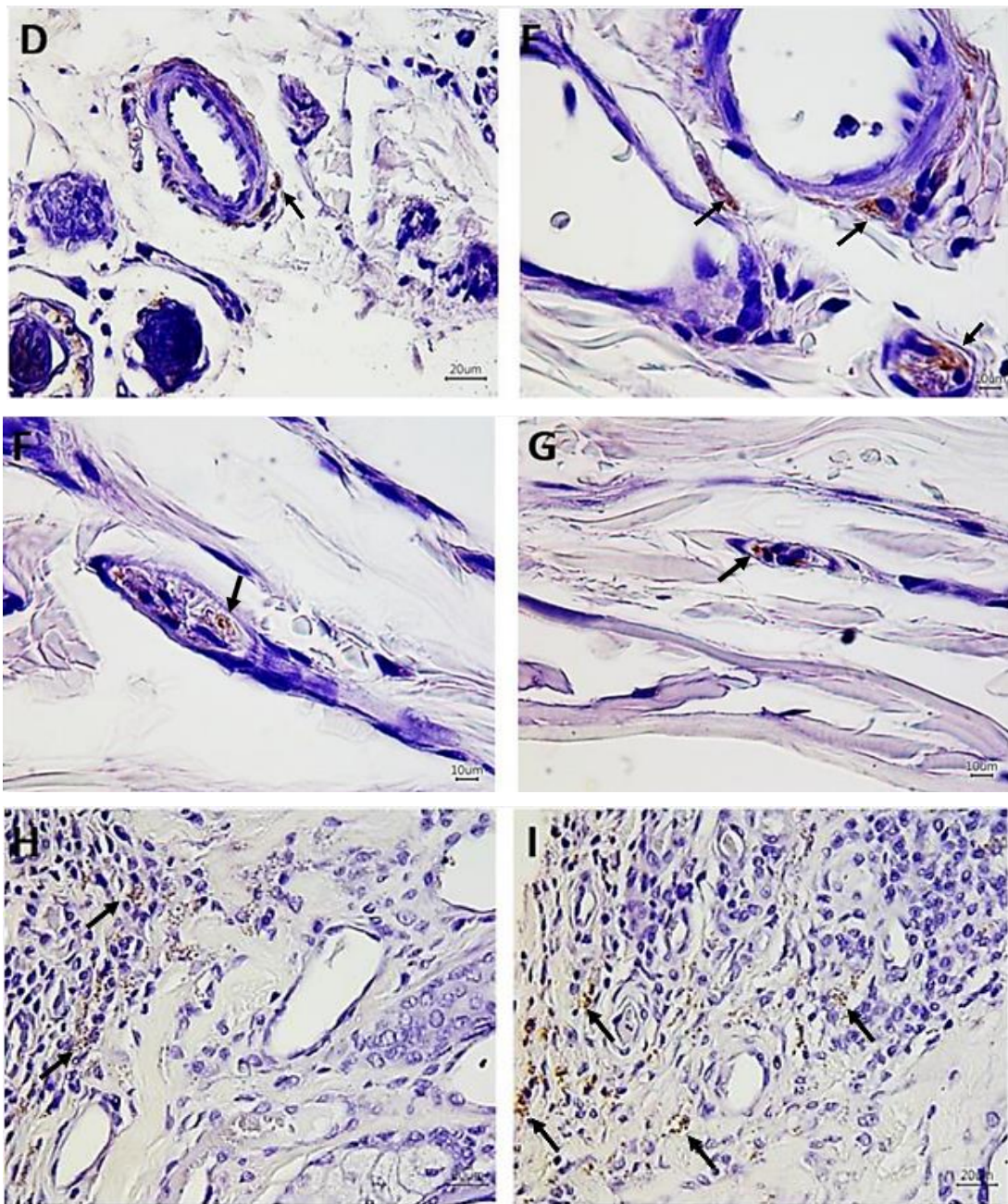


Figura 4.19 - Fotomicrografia de amastigotas marcadas por imuno-histoquímica (vermelho-DAB). Figura A: Amastigotas parasitando o citoplasma de células endoteliais. Figura B-E: Amastigotas localizadas em regiões perivasculares. Figura F e G: Amastigotas observadas dentro do vaso. Figuras H e I: Amastigotas difusas.

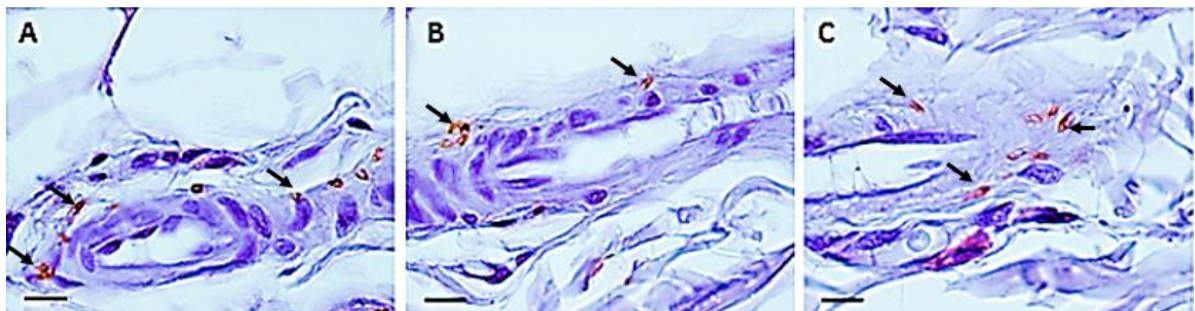


Figura 4.20 - Fotomicrografia de amastigotas e antígenos de amastigotas marcadas por imuno-histoquímica (vermelho-DAB). A, B e C: Amastigotas localizadas em regiões perivasculares na pele de abdômen do mesmo cão assintomático.

Ao analisar a distribuição de amastigotas pela derme e sua associação com o infiltrado inflamatório em ambos os grupos, fragmentos de pele de orelha e abdômen que apresentavam amastigotas distribuídas de forma difusa pela derme, em sua maioria, possuíam maior intensidade de infiltrado inflamatório, enquanto, fragmentos que apresentavam amastigotas principalmente parasitando regiões perivasculares, apresentaram menor intensidade de infiltrado (Fisher's exact test. P Value = *** * <0,0001) (Figura 4.21). Cães sem sinais clínicos, possuíam o parasito menos difuso na derme e mais restrito ao redor dos vasos sanguíneos, com um infiltrado leve . Em animais sintomáticos, a pele da orelha apresenta carga parasitária distribuída de forma mais difusa em relação ao abdômen e maior intensidade de infiltrado inflamatório. Em pele de abdômen, os animais possuíam um grau menor de infiltrado celular e um menor número de amastigotas parasitando a pele de forma difusa. Para analisar a significância estatística desses dados, foi utilizado o teste de Fisher. Foi possível observar uma associação entre a intensidade do infiltrado inflamatório e a distribuição de amastigotas em pele de orelha (Fisher's exact test. P Value = *0,010) as quais estavam distribuídas de forma difusa pela derme associadas a maior intensidade de infiltrado inflamatório (Figura 4.22A). Em pele de abdômen, a intensidade do infiltrado inflamatório também se associou à distribuição de amastigotas (Fisher's exact test. P Value = ** 0,005) as quais estavam em sua maioria restrita às regiões perivasculares associadas ao infiltrado inflamatório com variação de ausente a leve (Figura 4.22B).

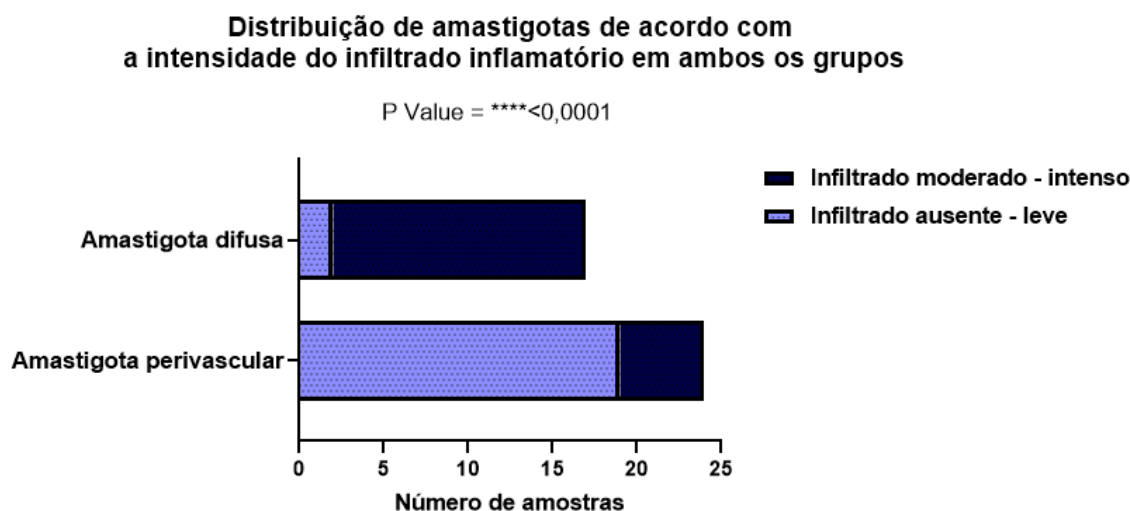


Figura 4.21 - Associação entre a distribuição de amastigotas e a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, Fisher's exact test.

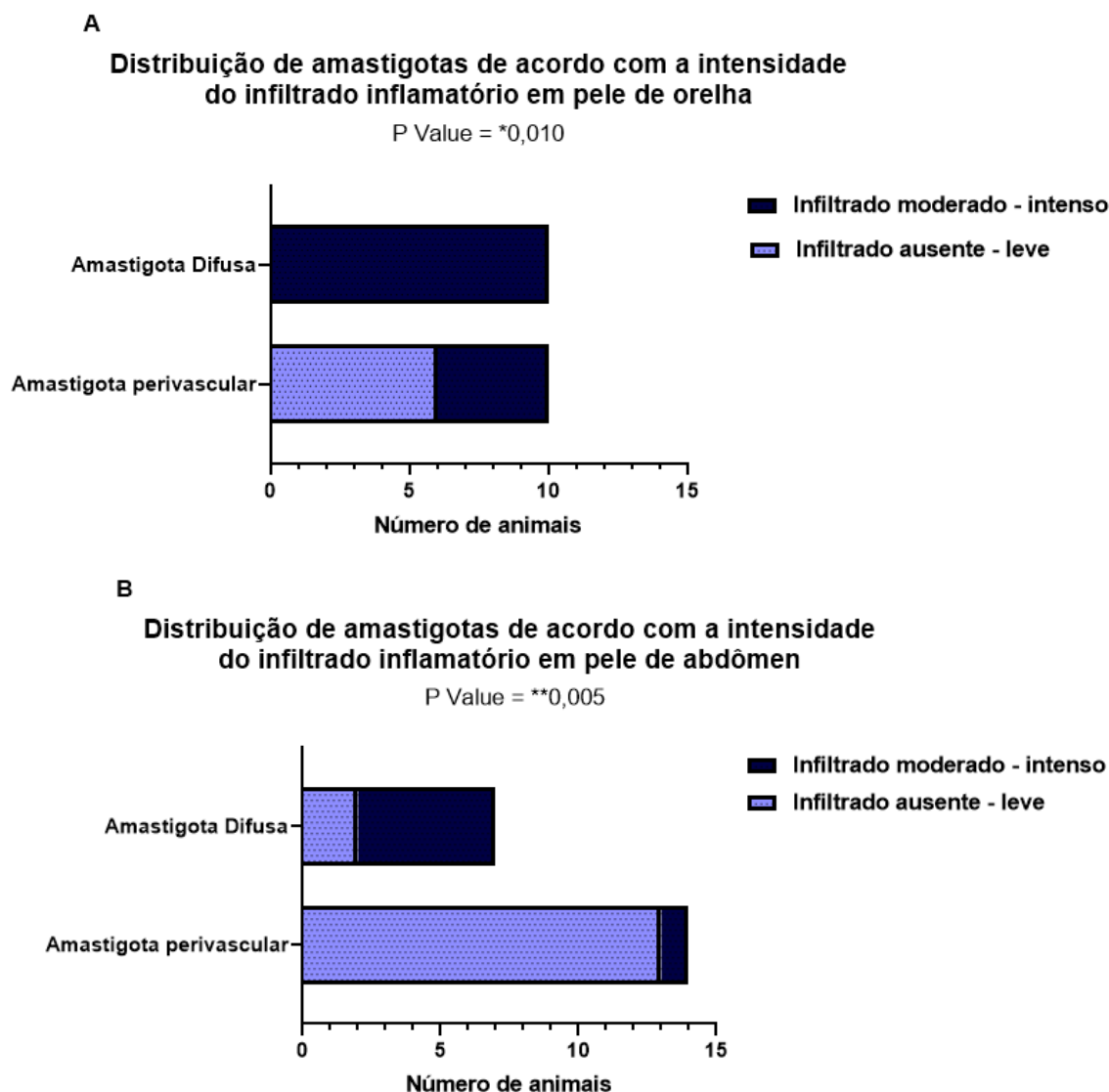


Figura 4.22 - Associação entre a distribuição de amastigotas e a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen. Fisher's exact test

4.9 A distribuição de amastigotas está associada à distribuição do infiltrado inflamatório em pele de orelha

Como foi observada a associação entre a distribuição de amastigotas e a intensidade do infiltrado inflamatório, foi analisada a associação entre a distribuição do infiltrado inflamatório e a distribuição de amastigotas pela derme. Foi possível observar associação entre a distribuição do infiltrado e a distribuição de amastigotas (Fisher's exact test. P Value = ** 0,007) as quais se apresentavam distribuídas de forma difusa em regiões de infiltrado inflamatório mais difuso (Figura 4.23). Analisando os fragmentos de pele de orelha e abdômen de forma individual, foi possível observar associação entre os dois parâmetros somente em pele de orelha (Fisher's exact

test. P Value = *0,025) (Figura 4.24A) os quais apresentavam maior distribuição de amastigotas em fragmentos de pele que apresentavam maior distribuição de infiltrado inflamatório. Em pele de abdômen, as amastigotas também se encontravam distribuídas de forma difusa em regiões que apresentavam infiltrado inflamatório difuso, mas não foi possível observar significância estatística entre os dados observados (Fisher's exact test. P Value = 0,50) (Figura 4.24B).

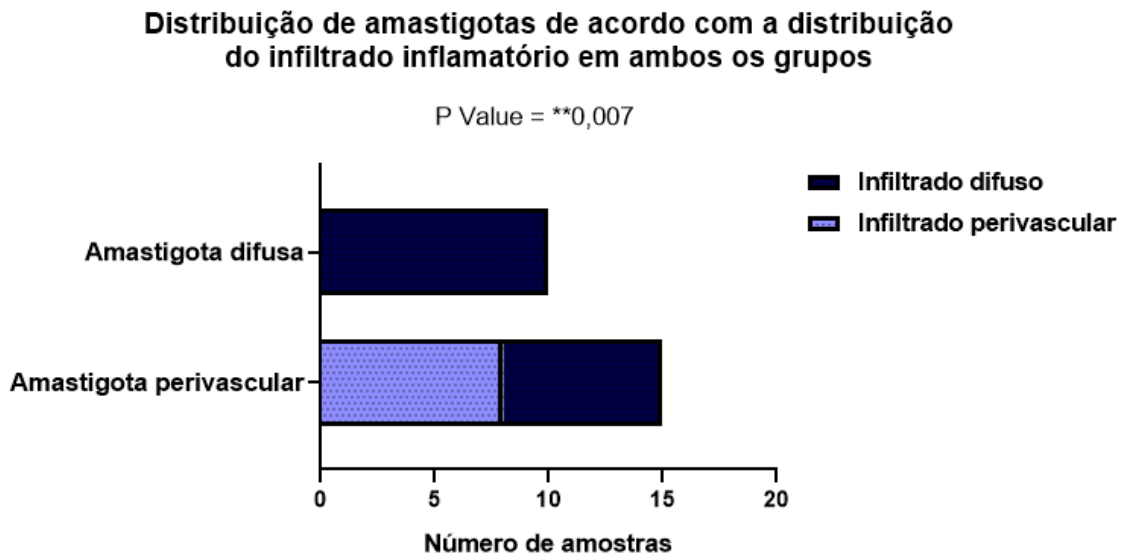
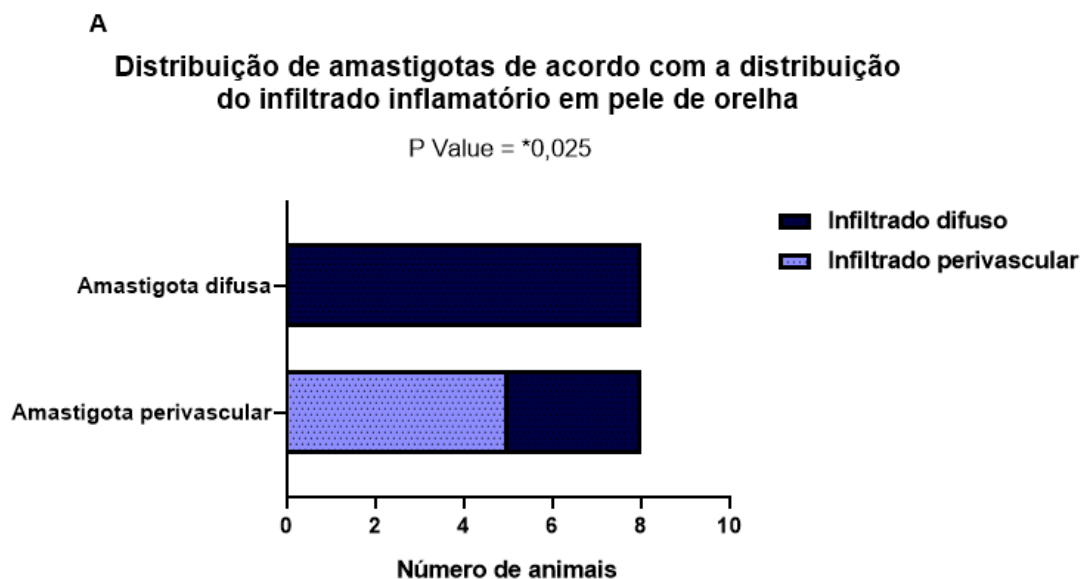


Figura 4.23 - Associação entre a distribuição de amastigotas e a distribuição do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.



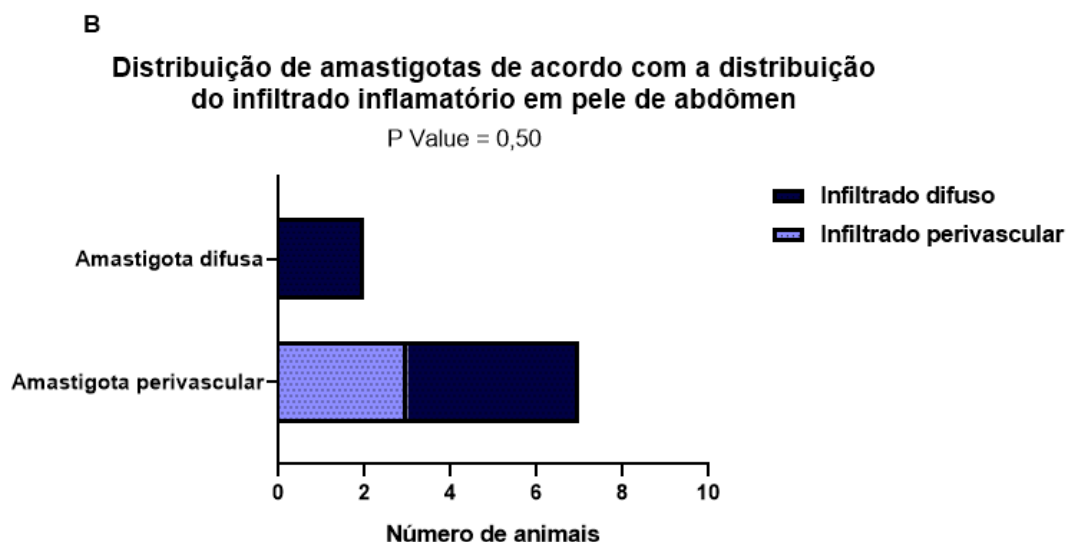


Figura 4.24 - Associação entre a distribuição de amastigotas e a distribuição do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen. Fisher's exact test.

4.10 Pele de orelha de animais sintomáticos possui maior diâmetro vascular em comparação com a pele de abdômen

Para analisar a dilatação vascular, foi realizada a medida do diâmetro dos vasos sanguíneos dérmicos e posterior análise comparativa entre a pele de orelha e abdômen de animais sintomáticos e assintomáticos. Foi possível observar maior diâmetro vascular em pele de orelha em comparação com a pele de abdômen (Willcoxon test P value = ***0,0009) (Figura 4.26). Analisando os grupos de acordo com a sintomatologia, em animais assintomáticos, o diâmetro vascular em pele de orelha se apresentou maior em comparação ao diâmetro em pele de abdômen, mas não houve significância estatística entre os dados (Figura 4.27A). Em cães com sintomatologia clínica, a pele da orelha apresentou vasos com diâmetros maiores do que aqueles vistos na pele de abdômen (Willcoxon test P value = **0,0042) (Figura 4.27B). A Figura 4.25 representa os achados descritos em relação ao diâmetro vascular nas duas regiões da pele.

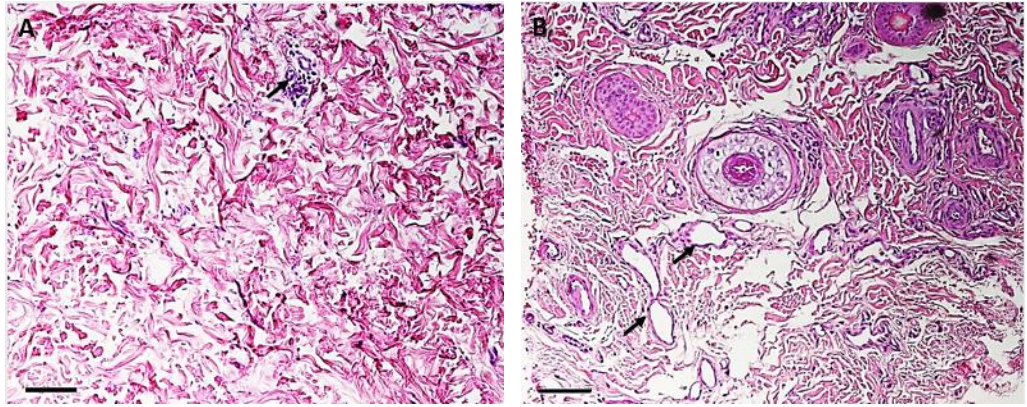


Figura 4.25 - Fotomicrografia da pele de orelha e abdômen de cão assintômico naturalmente infectado por *L. infantum*. A: Pele do abdômen com vasos dérmicos sem dilatação. B: Pele da orelha com vasos dérmicos com dilatação.

Diâmetro vascular de acordo com o fragmento de pele analisado em ambos os grupos

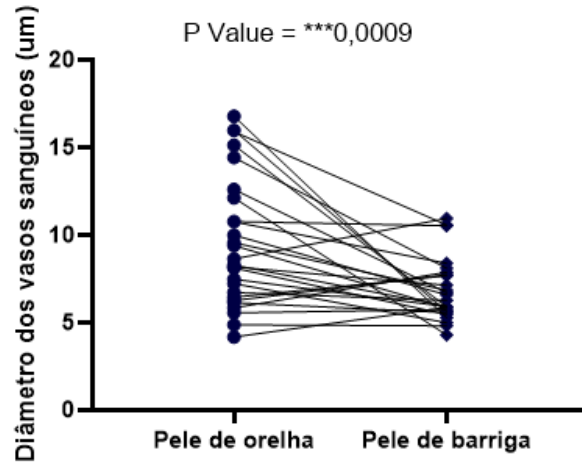


Figura 4.26 - Comparação entre o diâmetro vascular em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Willcoxon.test.

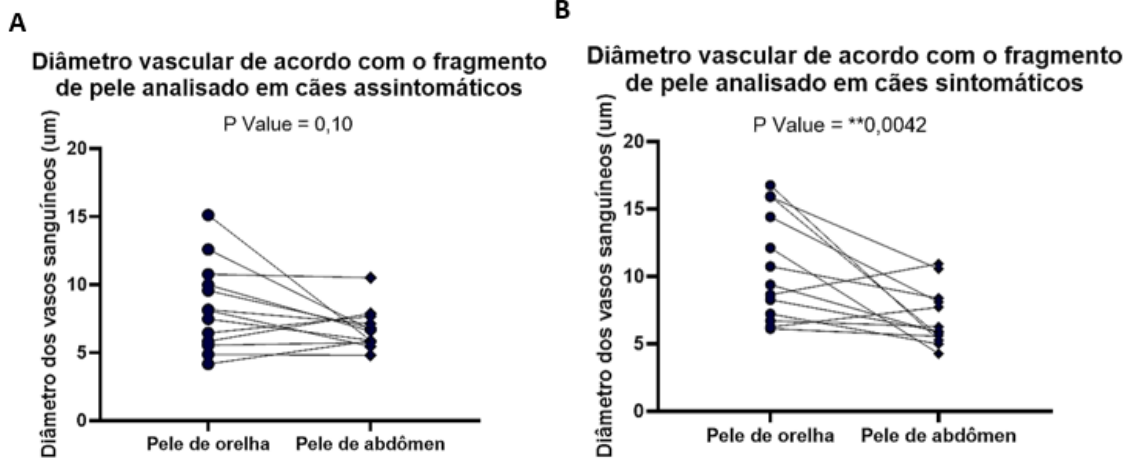


Figura 4.27 - Comparação entre o diâmetro vascular em pele de orelha e Abdômen de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Cães assintômicos. Figura B: Cães sintômáticos. Willcoxon Test.

4.11 O diâmetro vascular está associado à intensidade do infiltrado inflamatório

Como foi observado maior diâmetro vascular em pele de orelha de cães sintomáticos, assim como maior intensidade de infiltrado inflamatório, foi analisada a associação entre o diâmetro vascular e a intensidade do infiltrado. Foi observado maior diâmetro vascular em fragmentos de pele que apresentavam maior intensidade de infiltrado inflamatório (Mann-Whitney test P Value = $**0,0051$) (Figura 4.28). Ao analisar os dados de acordo com a região de pele (Figura 4.29A e B) e sintomatologia clínica (Figura 4.30A e B) não foram observadas diferenças estatísticas.

Diâmetro vascular de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em ambos os grupos

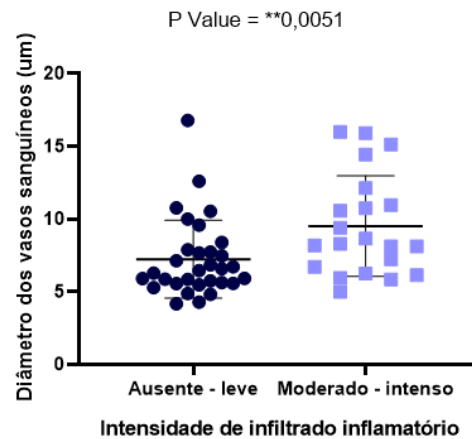


Figura 4.28 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Mann-Whitney test.

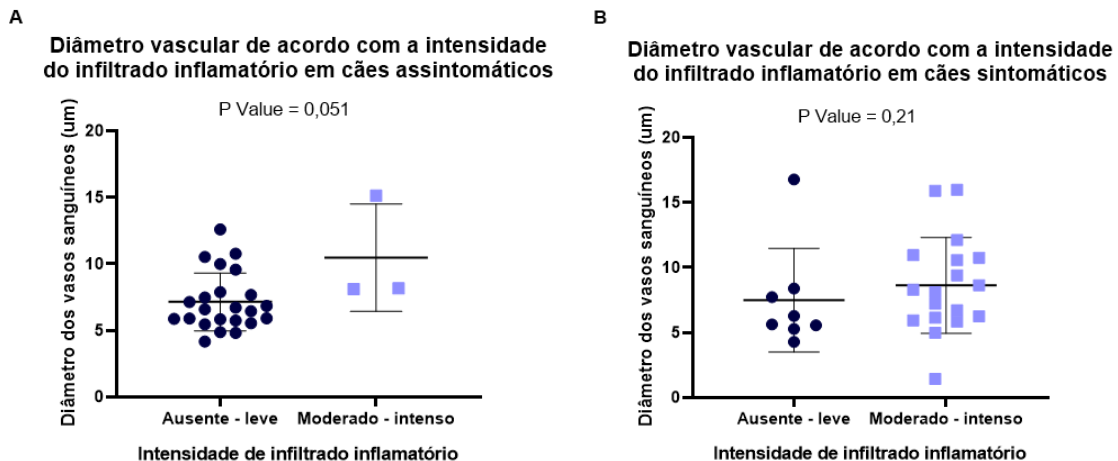


Figura 4.29 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos. Mann-Whitney test.

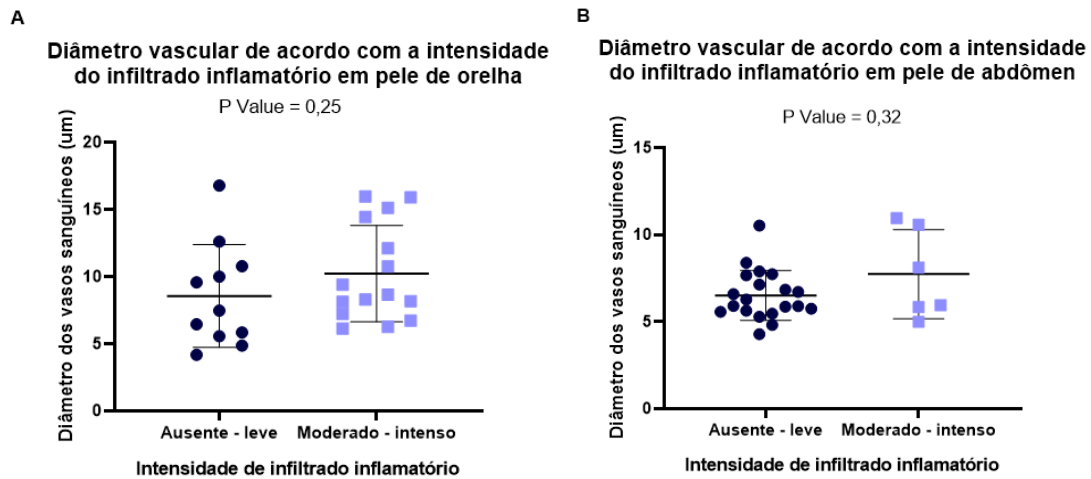


Figura 4.30 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen. Mann-Whitney test.

4.12 Diâmetro vascular está associado à presença de infiltrado inflamatório

Ao analisar a associação entre o diâmetro vascular e a presença ou ausência de infiltrado inflamatório, foi observada associação entre os dois parâmetros (Mann-Whitney test P Value = *0,023) (Figura 4.31). Analisando individualmente de acordo com a sintomatologia clínica, foi observada uma tendência de associação entre a presença do infiltrado inflamatório e o diâmetro vascular em animais sem sintomatologia clínica (Mann-Whitney test P Value = 0,053) (Figura 4.32A).

Diâmetro vascular de acordo com a presença do infiltrado inflamatório em ambos os grupos

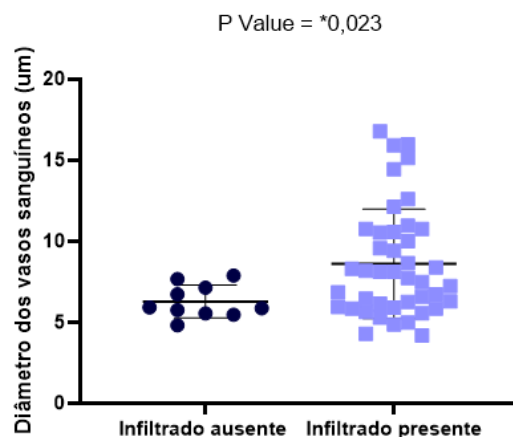


Figura 4.31 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a presença ou ausência do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Mann-Whitney test.

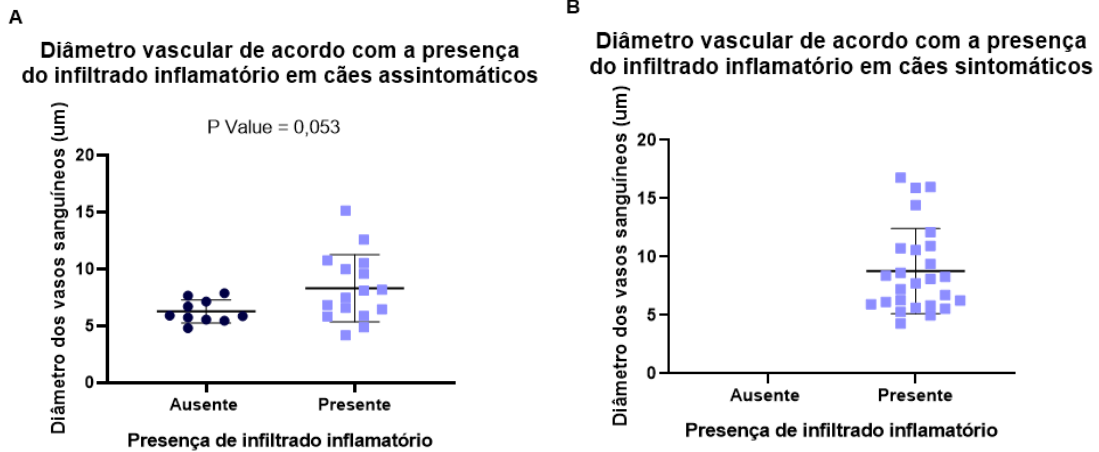
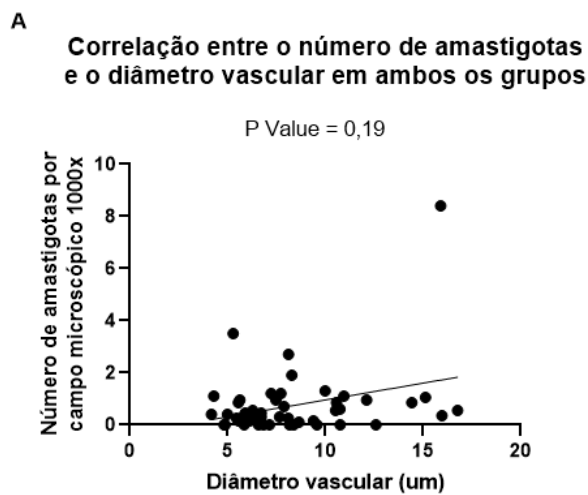


Figura 4.32 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a presença ou ausência do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães Sintomáticos. Mann-Whitney test.

4.13 Não houve correlação entre o número de amastigotas presentes na derme e o diâmetro vascular

Não foi observada correlação entre estes dois parâmetros mesmo quando sintomatologia ou região de pele foram avaliados (Figura 4.33 A-E)



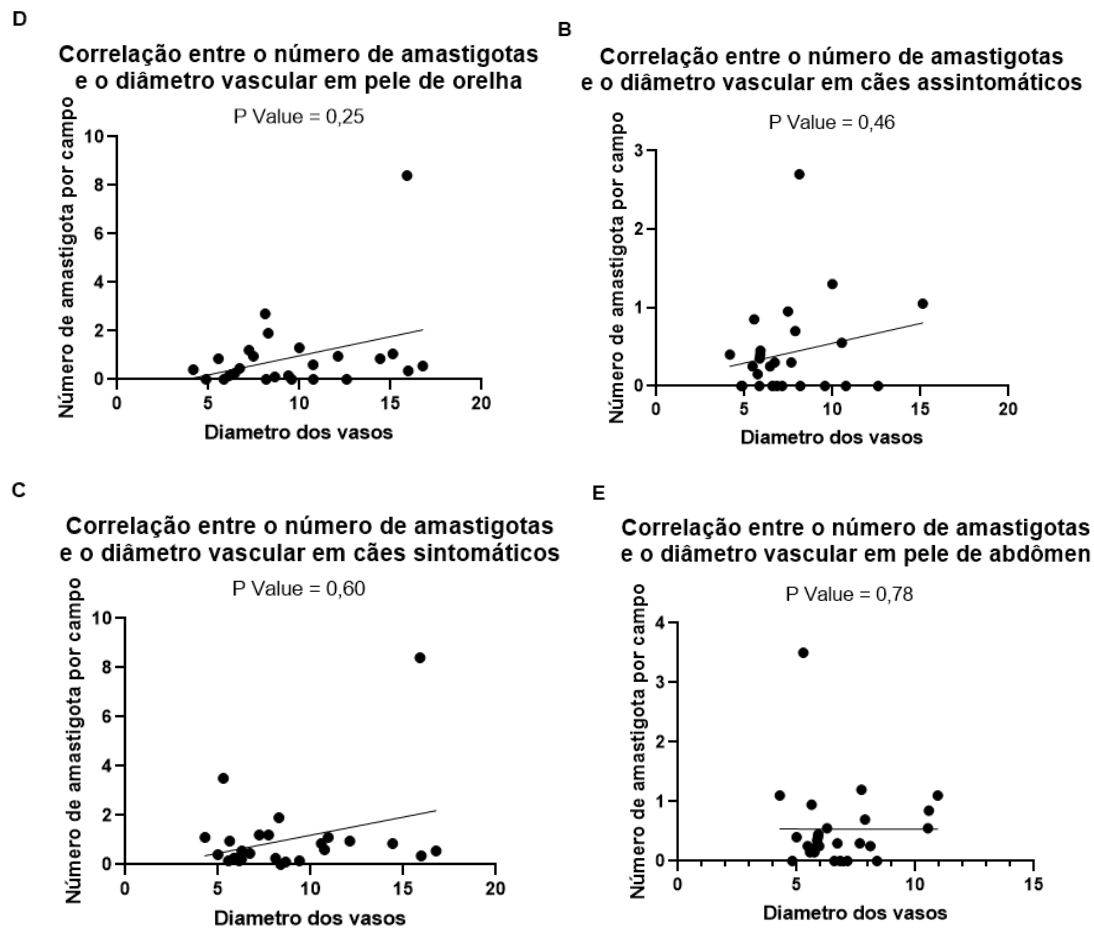


Figura 4.33 - Correlação entre o diâmetro vascular e o número de amastigotas de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Total. Figura B: Cães assintomáticos. Figura C: Cães Sintomáticos. Figura D: Pele de orelha. Figura E: Pele de abdômen.

4.14 Não houve associação entre o diâmetro vascular e a distribuição de amastigotas

Ao avaliar a distribuição de amastigotas pela derme e o diâmetro vascular, não foi possível observar associação entre os dois parâmetros (Figura 4.34). Além disso, não foi possível observar associação entre o diâmetro vascular e a presença de amastigotas (Figura 4.35).

Diâmetro vascular de acordo com a distribuição de amastigotas em ambos os grupos

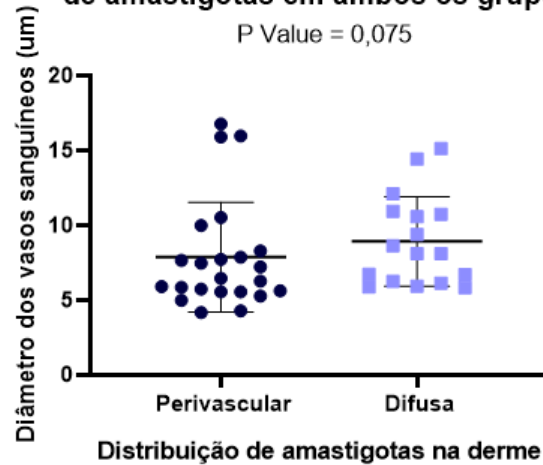


Figura 4.34 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a distribuição de amastigotas em pele de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Mann-Whitney test.

Diâmetro vascular de acordo com a presença de amastigotas em ambos os grupos

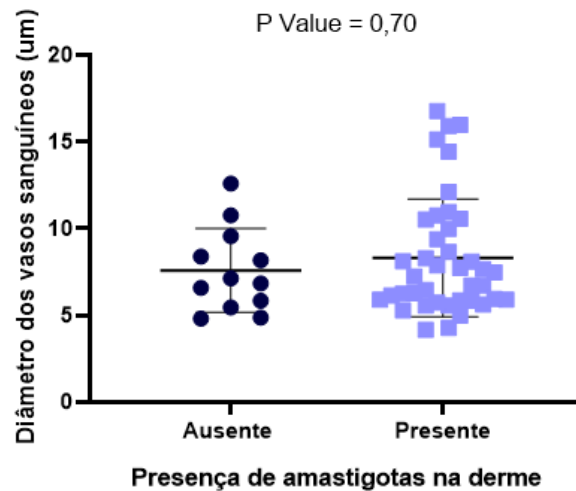


Figura 4.35 - Diâmetro dos vasos sanguíneos de acordo com a presença ou ausência de amastigotas em pele de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Mann-Whitney test.

4.15 Pele de orelha possui maior número de vasos sanguíneos em comparação com a pele de abdômen

Foi realizada a análise do número de vasos sanguíneos em pele de orelha e abdômen de cães sintomáticos e assintomáticos. O número de vasos sanguíneos foi mais elevado em pele de orelha independente de manifestações clínicas (Willcoxon test P value= *0,037) (Figura 4.36). Em cães assintomáticos, não foi observada diferença estatística ao comparar o número de vasos

sanguíneos em pele de orelha e abdômen (Willcoxon test P value = 0,45) (Figura 4.37A). Enquanto em cães sintomáticos, foi possível observar diferenças significantes entre o número de vasos em pele de orelha e abdômen (Willcoxon test P value = *0,048) (Figura 4.37B).

Número de vasos sanguíneos de acordo com o fragmento de pele analisado em ambos os grupos
P Value = *0,037

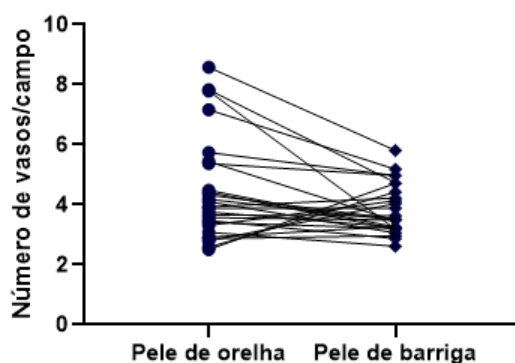


Figura 4.36 - Comparação entre o número de vasos sanguíneos em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *L.infantum*. Willcoxon test

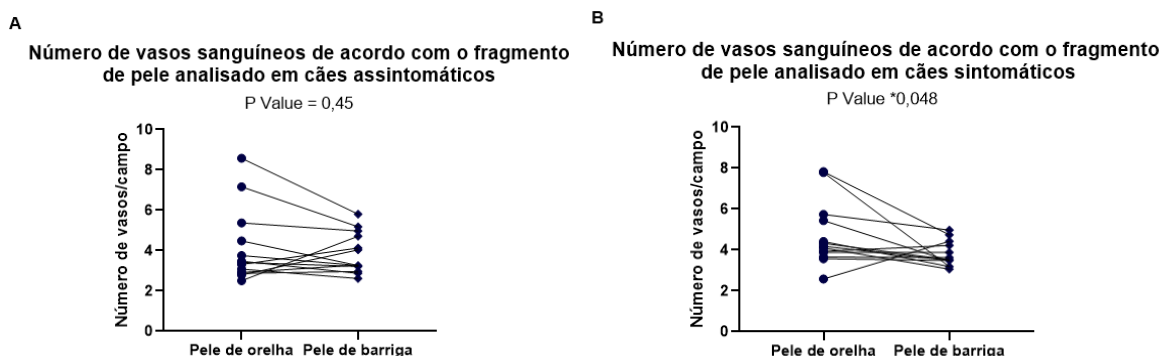


Figura 4.37 - Comparação entre o número de vasos sanguíneos em pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos. Willcoxon test.

4.16 Número de vasos sanguíneos está associado à intensidade do infiltrado inflamatório

Ao analisar a associação entre o número de vasos sanguíneos dérmicos e a intensidade do infiltrado inflamatório em pele, foi possível observar que cães que apresentam maior intensidade de infiltrado inflamatório, possuem maior número de vasos sanguíneos (Mann-Whitney test P Value = *0,041) (Figura 4.38). Analisando os grupos de acordo com a sintomatologia, tal associação foi observada somente em cães sintomáticos (Mann-Whitney test P Value = *0,039) (Figura 4.39B). Esta associação não foi observada quando a região da pele

era considerada (Figura 4.40), e nem quando se correlacionou o número de vasos sanguíneos e a distribuição do infiltrado inflamatório (Figura 4.41).

Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em ambos os grupos

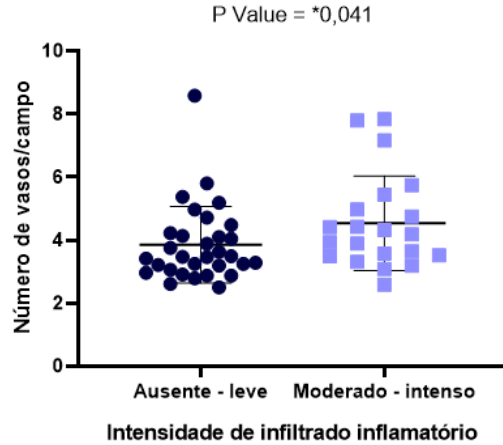
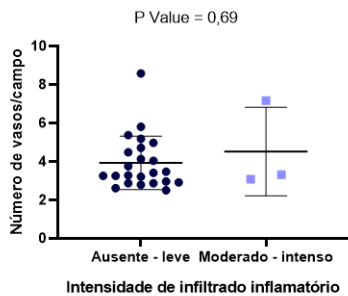


Figura 4.38 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Mann-Whitney test.

A Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães assintomáticos



B Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães sintomáticos

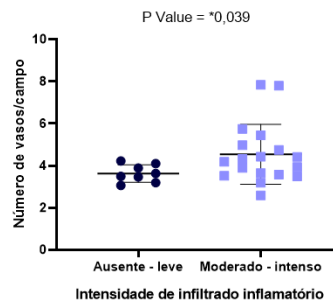
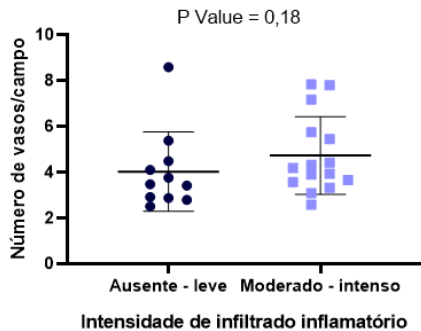


Figura 4.39 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Cães assintomáticos. Figura B: Cães sintomáticos. Mann-Whitney test.

A Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de orelha



B Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em pele de abdômen

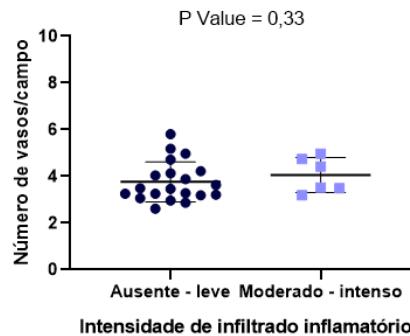


Figura 4.40 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen. Mann-Whitney test.

Número de vasos sanguíneos de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório em ambos os grupos

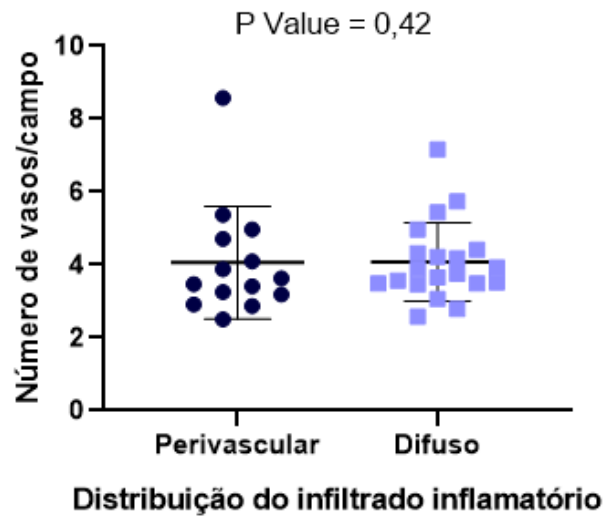


Figura 4.41 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Mann-Whitney test.

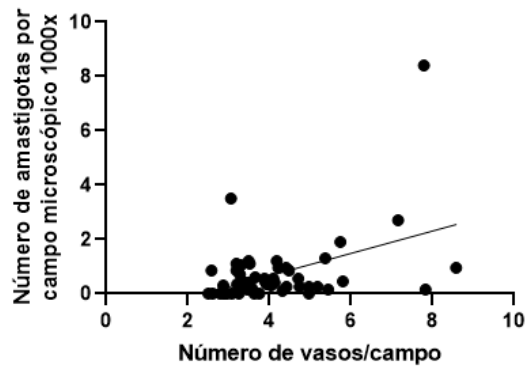
4.17 Número de vasos sanguíneos está correlacionado com a carga parasitária

Foi avaliada a correlação entre o número de amastigotas presentes na derme e o número de vasos sanguíneos. Foi observada uma correlação positiva entre os dois parâmetros (Correlação de Spearman, P Value = *0,017, $r= 0,32$) (Figura 4.42A). Os dados indicam que as maiores cargas parasitárias ocorrem de forma proporcional ao maior número de vasos sanguíneos dérmicos, demonstrando um possível papel da vascularização dérmica no aumento da carga parasitária da pele. Ao considerarmos os diferentes grupos, essa correlação foi observada somente em cães sintomáticos (Correlação de Spearman, P Value = ***0,0002, $r= 0,66$) (Figura 4.42B) e em pele de orelha (Correlação de Spearman, P Value = **0,0018, $r= 0,58$) (Figura 4.42D). Ao avaliar a associação entre a distribuição de amastigotas pela derme e o número de vasos sanguíneos, não foi possível observar associação entre os dois parâmetros (Figura 4.43).

A

Correlação entre o número de amastigotas e o número de vasos sanguíneos em ambos os grupos

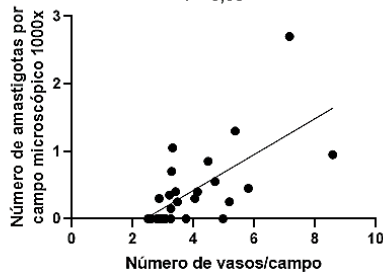
P Value = *0.017
r = 0.32



B

Correlação entre o número de amastigotas e o número de vasos sanguíneos em cães assintomáticos

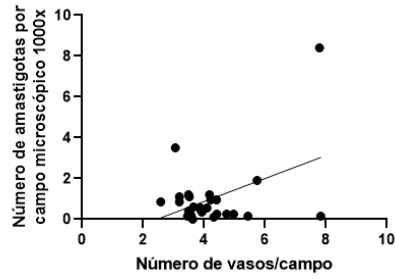
P Value = ***0,0002
r = 0,66



C

Correlação entre o número de amastigotas e o número de vasos sanguíneos em cães sintomáticos

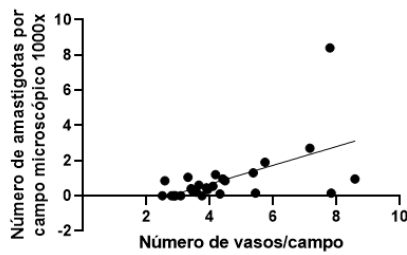
P Value = 0,37



D

Correlação entre o número de amastigotas e o número de vasos sanguíneos em pele de orelha

P Value = **0.0018
r = 0.58



E

Correlação entre o número de amastigotas e o número de vasos sanguíneos em pele de abdômen

P Value = 0,85

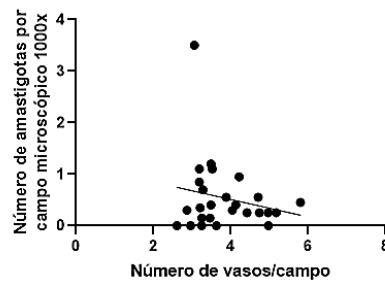


Figura 4.42 - Correlação entre o número de vasos e o número de amastigotas de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Figura A: Total. Figura B: Cães Assintomáticos. Figura C: Cães Sintomáticos. Figura D: Pele de orelha. Figura E: Pele de abdômen. Correlação de Spearman.

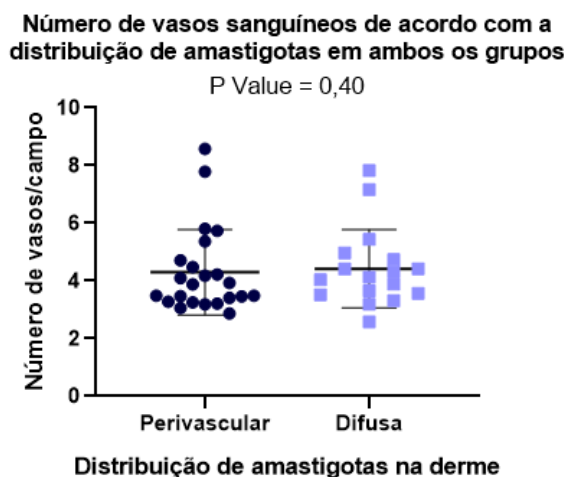


Figura 4.43 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a distribuição de amastigotas em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Mann-Whitney test.

4.18 Número de vasos sanguíneos dérmicos está associado à presença de amastigotas

O número de vasos sanguíneos dérmicos se associou à presença de amastigotas em pele de cães infectados (Mann-Whitney test P Value = **0,0041) (Figura 4.44). Ao considerarmos a região da pele, foi observada associação entre o número de vasos sanguíneos e a presença de carga parasitária somente em pele de orelha (Mann-Whitney test P Value = **0,0011) (Figura 4.45A), corroborando com os dados anteriores. Assim, em pele de orelha, o número de vasos sanguíneos se correlaciona com o número de amastigotas presentes na derme, além de se associar com a presença de carga parasitária nesse local.

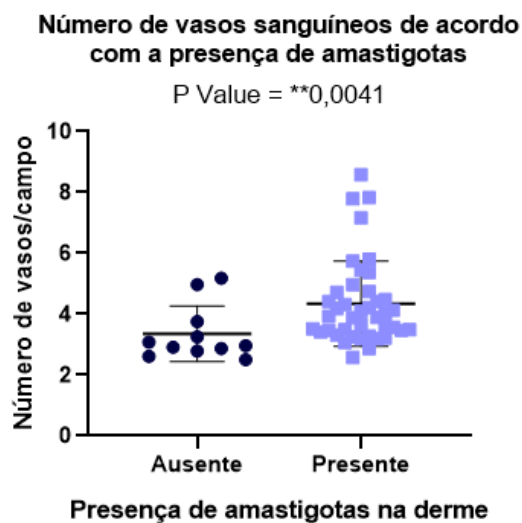


Figura 4.44 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a presença de amastigotas em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Mann-Whitney test.

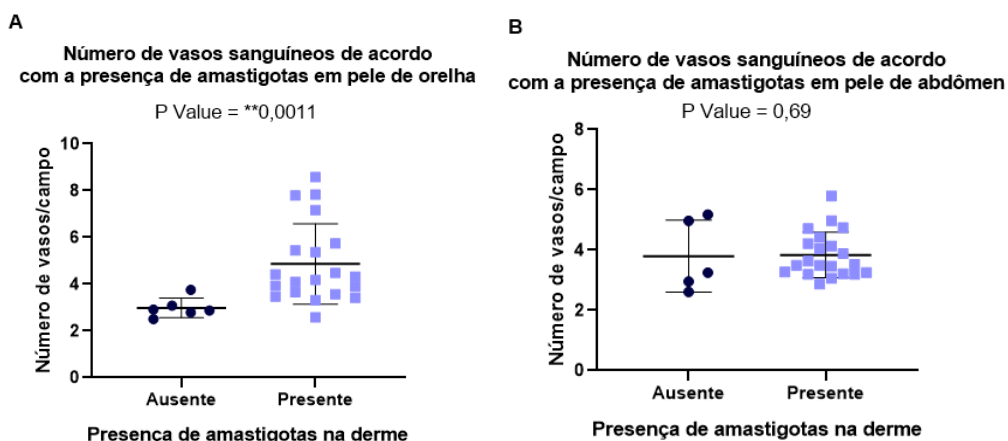


Figura 4.45 - Número de vasos sanguíneos de acordo com a presença de amastigotas em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Figura A: Pele de orelha. Figura B: Pele de abdômen. Mann-Whitney test.

4.19 Pele de orelha de cães com sintomatologia clínica apresentam menor quantidade de colágeno dérmico

Para realizar uma análise comparativa entre a quantidade de colágeno em pele de orelha e abdômen de acordo com a sintomatologia clínica, foram utilizados cortes de pele corados com o Vermelho de Picrosirius. Foi feita uma análise qualitativa onde se considerou a presença ou ausência de redução na quantidade de colágeno dérmico. De acordo com os dados observados, cães sintomáticos apresentam menor quantidade de colágeno em comparação à cães assintomáticos (Fisher's exact test. P Value = ***<0,0001) (Figura 4.47). Considerando a região da pele estudada, uma menor quantidade de colágeno foi observada com maior frequência em pele de orelha de animais sintomáticos (Fisher's exact test. P Value = **0,0048) (Figura 4.48A). O mesmo dado foi observado em pele de abdômen, sendo que nesta região todos os cães assintomáticos apresentaram regularidade na quantidade de colágeno (Fisher's exact test. P Value = **0,0052) (Figura 4.48B), indicando que em pele de orelha de cães sintomáticos a menor quantidade de colágeno é observada em maior frequência. A Figura 4.46 representa os dados observados em relação a quantidade de colágeno dérmico presente nas duas regiões da pele.

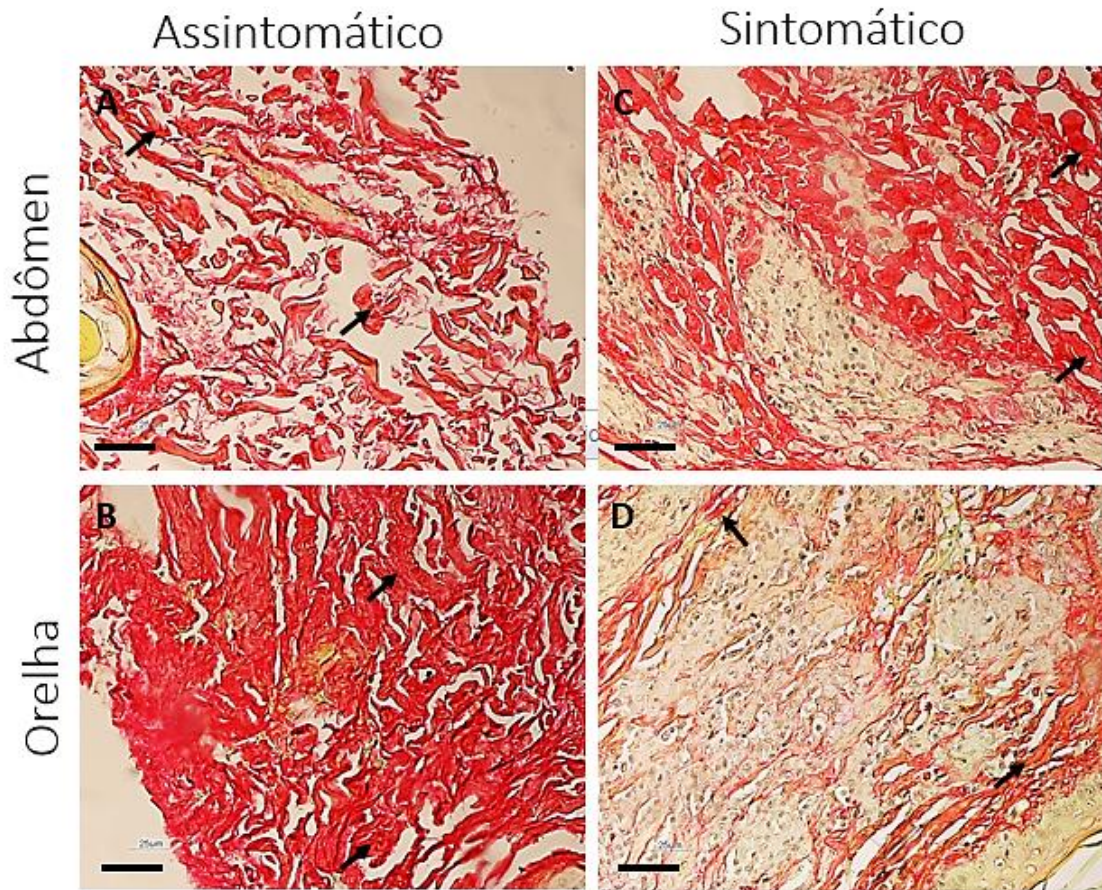


Figura 4.46 - Fotomicrografia da pele de orelha e abdômen de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A: Pele de abdômen de cão assintomático. B: Pele de orelha do mesmo cão da imagem A. C: Pele de abdômen de cão sintomático. D: Pele de orelha do mesmo cão da imagem C.

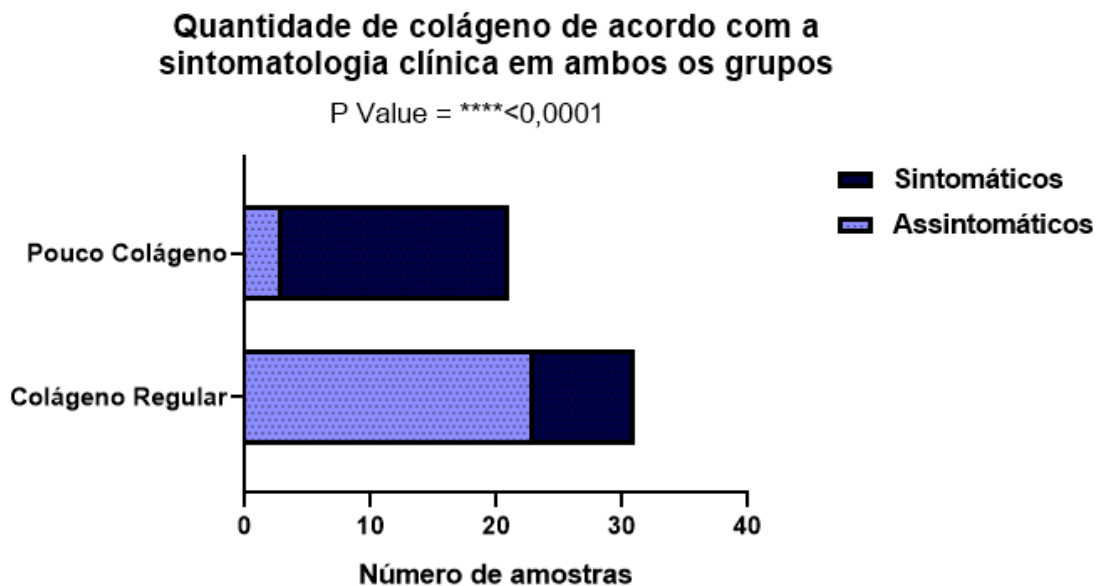


Figura 4.47 - Número de amostras de pele de cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a quantidade de colágeno observada. Fisher's exact test.

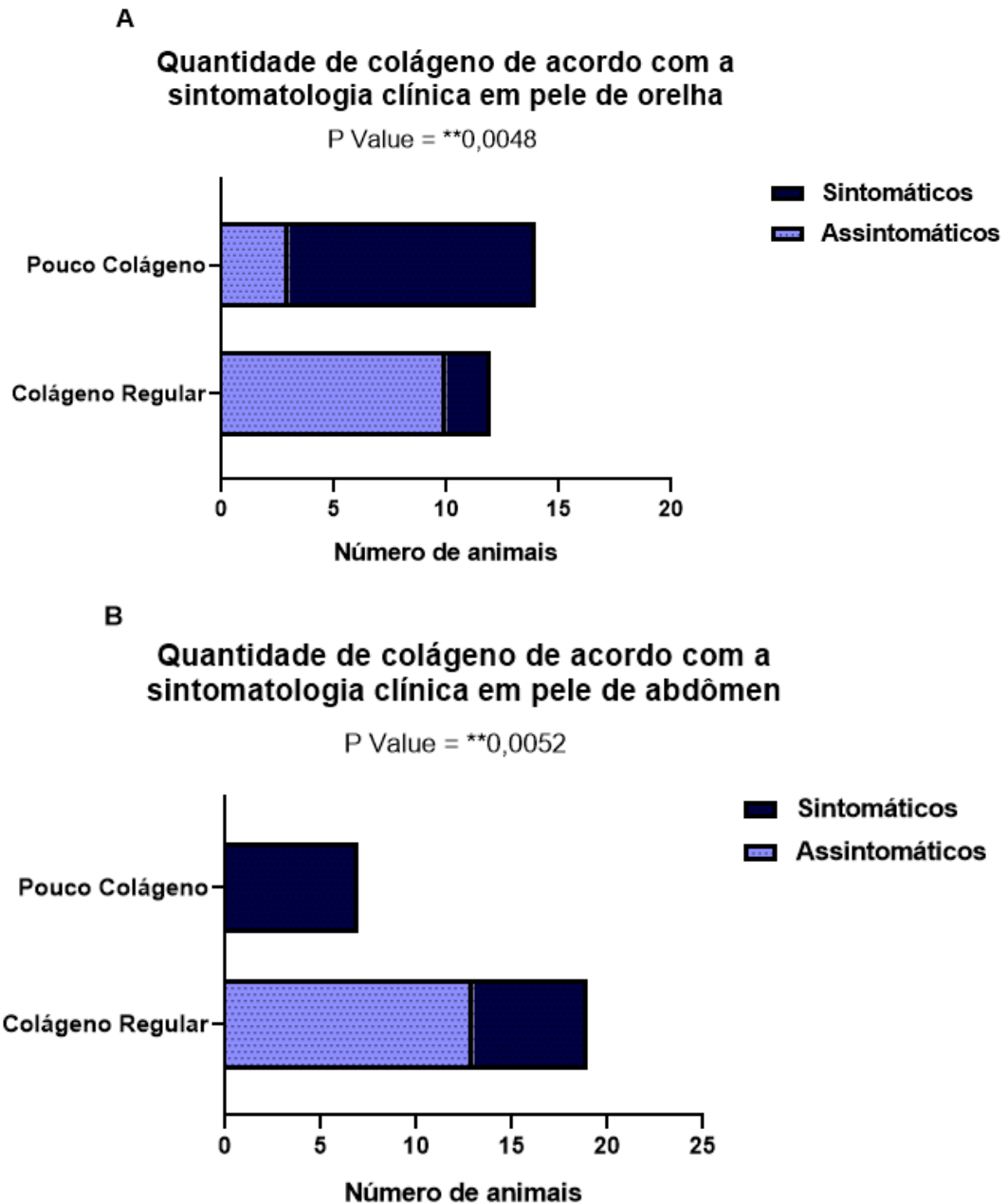


Figura 4.48 - Número de animais sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a quantidade de colágeno observada A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen. Fisher's exact test.

4.20 Quantidade de colágeno presente na derme está associada à intensidade do infiltrado inflamatório

Analisando a quantidade de colágeno levando em consideração a intensidade do infiltrado inflamatório, foi possível observar que a maioria dos cães que apresentam infiltrado inflamatório com variação de ausente a leve, apresentam maior regularidade de colágeno na derme (Fisher's exact test. P Value = ***<0,0001) (Figura 4.49). Ao considerarmos a

sintomatologia clínica, a maior regularidade de colágeno de associou à ausência ou menor intensidade de infiltrado inflamatório em cães assintomáticos (Fisher's exact test. P Value = ***0,0004) (Figura 4.50A), enquanto em cães sintomáticos, a maioria dos animais que apresentaram menor quantidade de colágeno dérmico, apresentaram maior intensidade de infiltrado inflamatório (Fisher's exact test. P Value = **0,0028) (Figura 4.50B). Ao considerar a região da pele, a pele de orelha apresentou menor quantidade de colágeno se associando à maior intensidade do infiltrado inflamatório (Fisher's exact test. P Value = ***<0,0001) (Figura 4.51A), enquanto em pele de abdômen, foi observada ausência ou menor intensidade de infiltrado inflamatório se associando à regularidade de colágeno nesse local (Fisher's exact test. P Value = **0,0018) (Figura 4.51B).

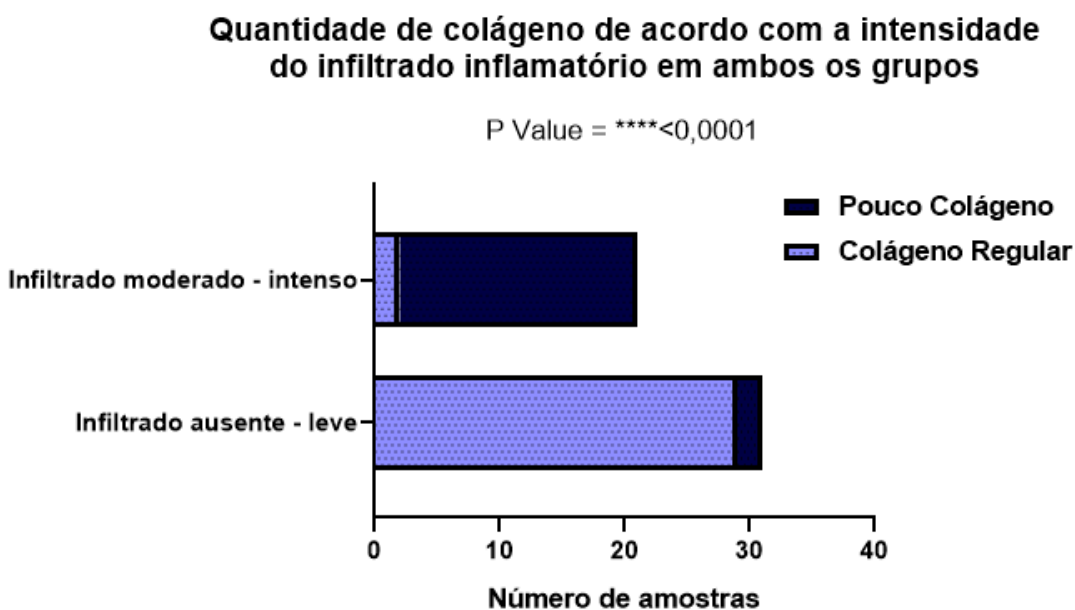
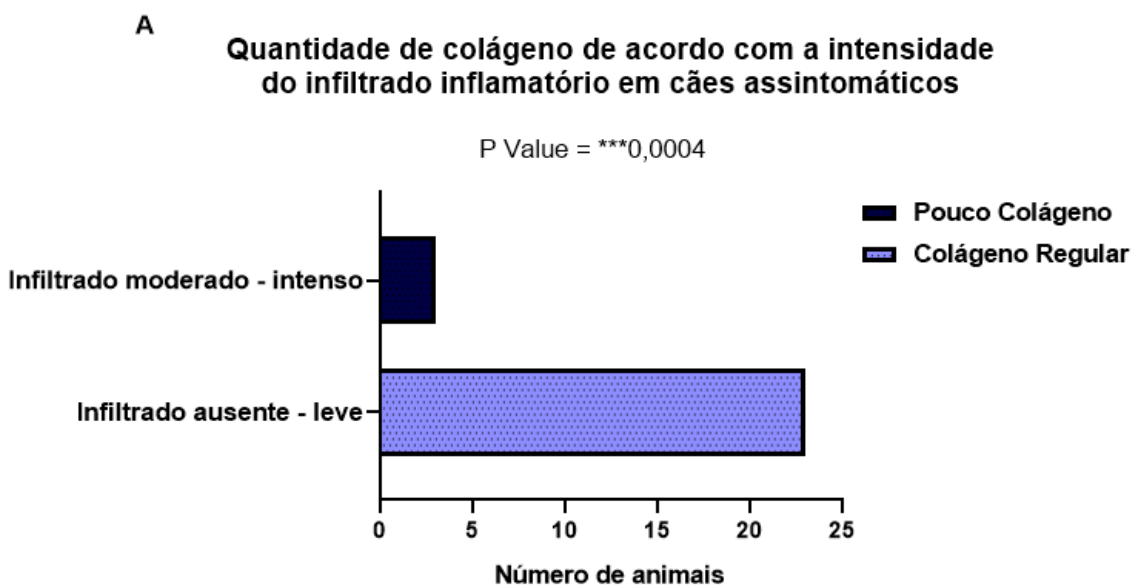


Figura 4.49 - Quantidade de colágeno em amostras de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. Fisher's exact test.



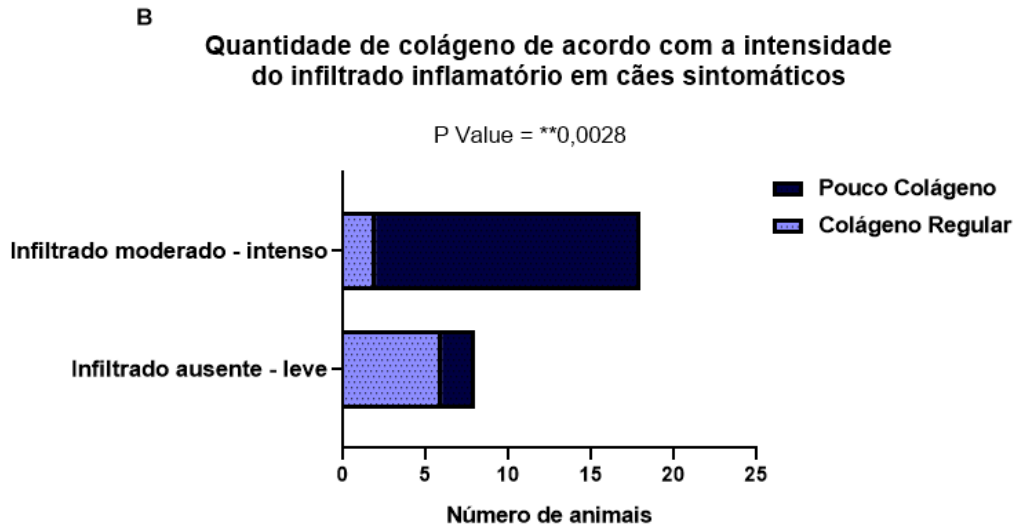


Figura 4.50 - Quantidade de colágeno em amostras de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório. A: Cães assintomáticos. B: Cães Sintomáticos. Fisher's exact test.

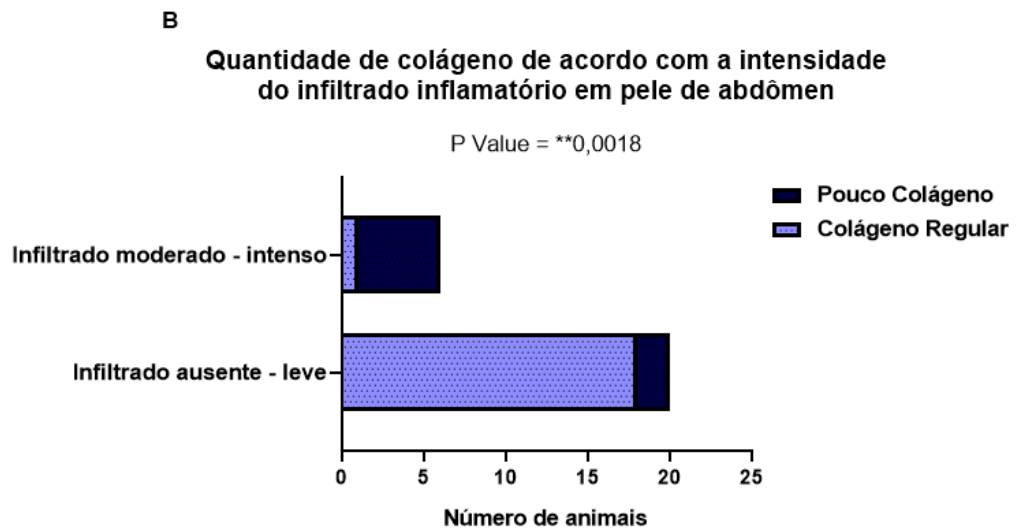
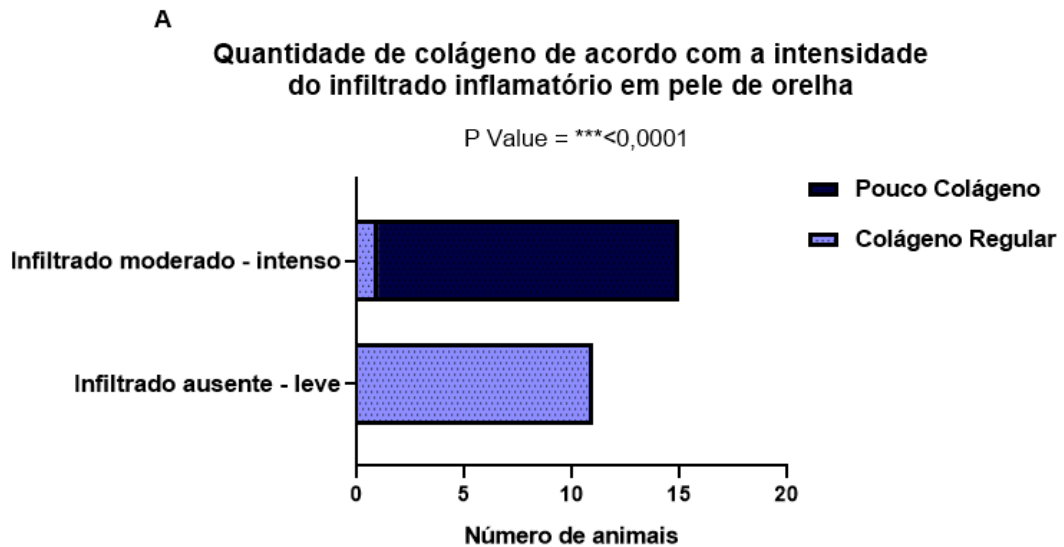


Figura 4.51 - Quantidade de colágeno de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen. Fisher's exact test

4.21 A diminuição na quantidade de colágeno dérmico está associada à distribuição do infiltrado inflamatório

Ao analisar a distribuição do infiltrado inflamatório e a quantidade de colágeno presente nos fragmentos de pele, foi possível observar associação entre estes dois parâmetros. Assim, cães que apresentaram infiltrado inflamatório distribuído de forma difusa pela derme, também apresentaram menor quantidade de colágeno dérmico (Fisher's exact test. P Value = $***<0,0001$) (Figura 4.52). Ao considerar a sintomatologia clínica, só foi possível observar associação entre os dois parâmetros em animais sintomáticos (Fisher's exact test. P Value = $*0,011$) (Figura 4.53B). Analisando a região da pele, só foi possível observar associação entre os dois parâmetros em pele de orelha (Fisher's exact test. P Value = $**0,001$) (Figura 4.54A).

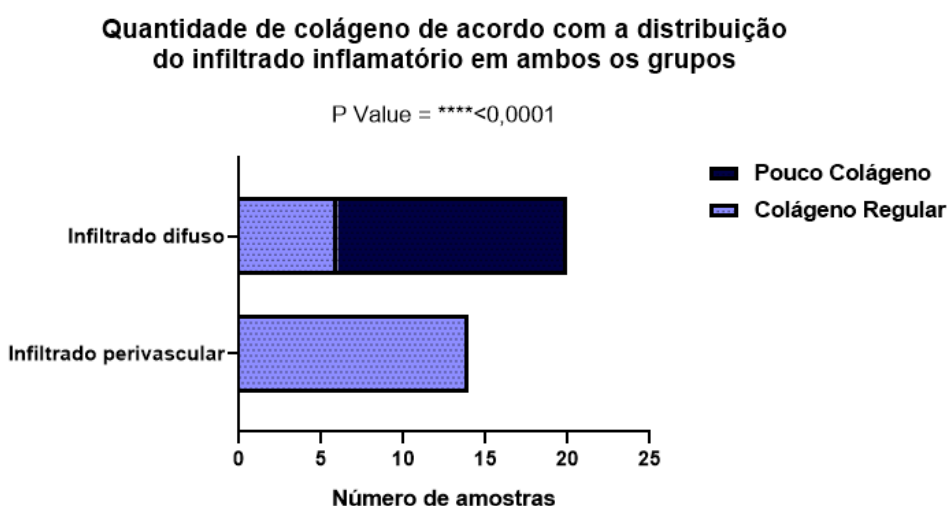
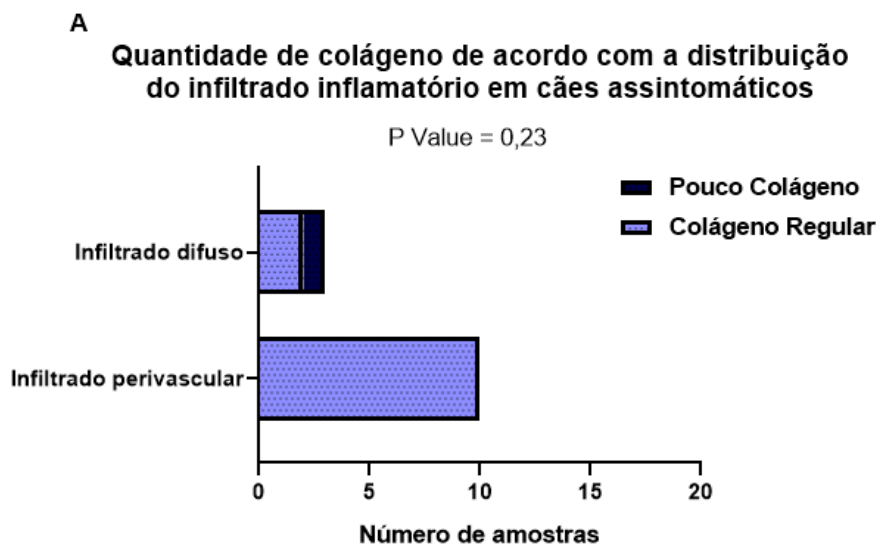


Figura 4.52 – Quantidade de colágeno em amostras de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. Fisher's exact test.



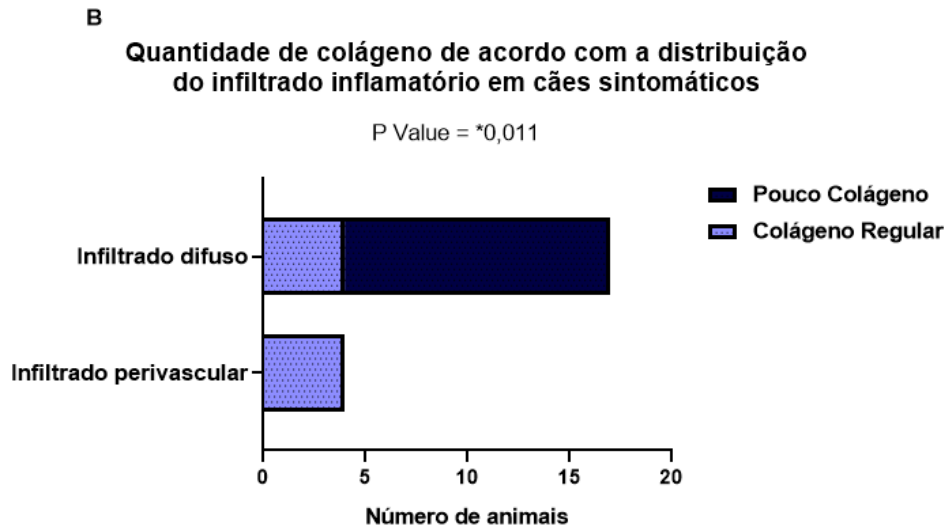


Figura 4.53 - Quantidade de colágeno em amostras de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. A: Cães assintomáticos. B: Cães sintomáticos. Fisher's exact test.

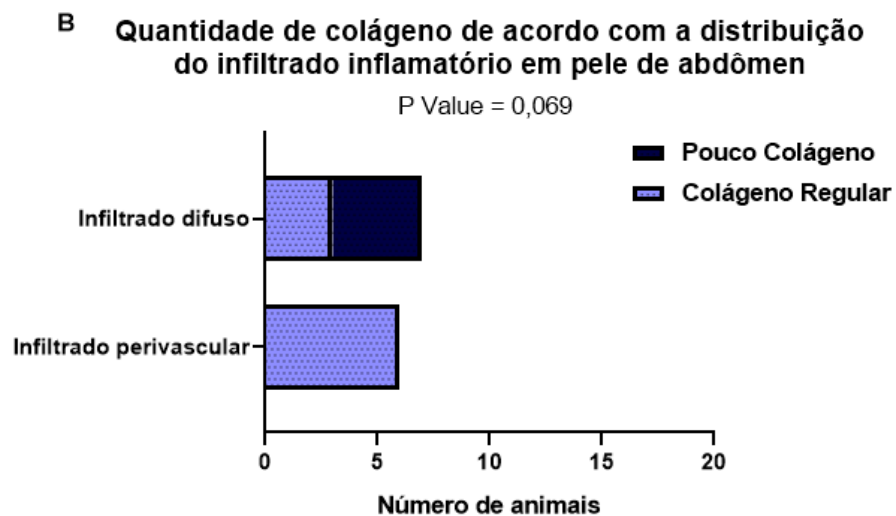
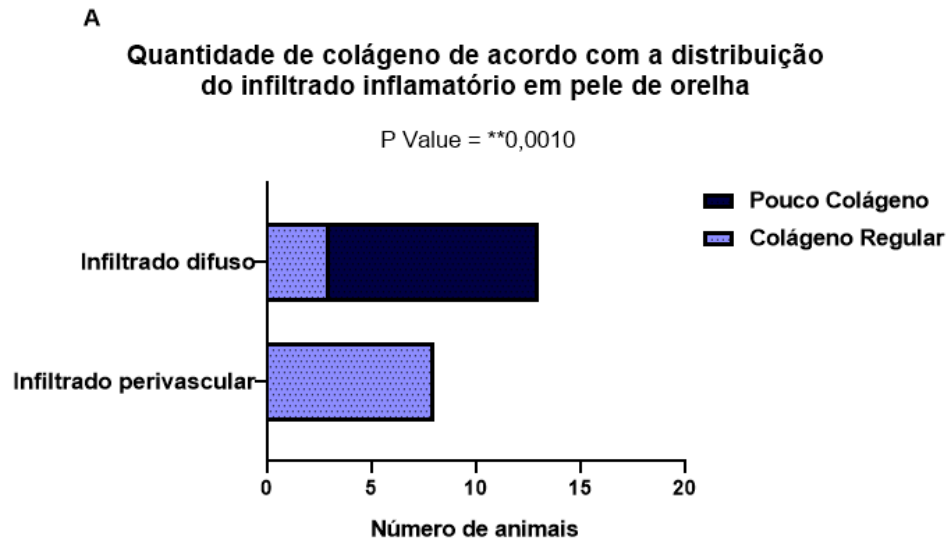


Figura 4.54 - Quantidade de colágeno em pele cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a distribuição do infiltrado inflamatório. A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen. Fisher's exact test.

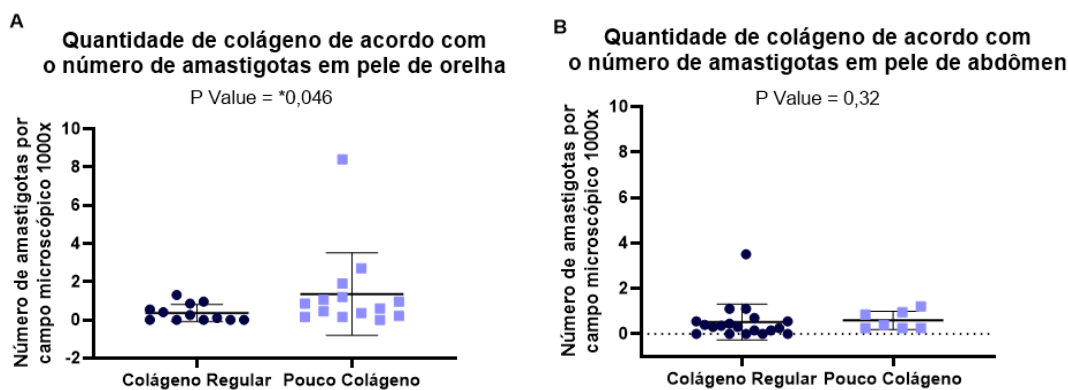


Figura 4.57 - Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com o número de amastigotas. A: Pele de orelha. B: Pele de abdômen. Mann-Whitney test

4.23 A menor quantidade de colágeno dérmico está associada à distribuição de amastigotas

Ao analisar a associação entre a quantidade de colágeno dérmico e a distribuição da carga parasitária, foi possível observar associação entre os dois parâmetros (Fisher's exact test P Value = **0,0044) (Figura 4.58). Ao considerarmos a sintomatologia clínica, cães assintomáticos apresentaram uma tendência de associação entre os dois parâmetros (Fisher's exact test P Value = 0,050) (Figura 4.59A), os quais em sua maioria apresentaram amastigotas localizadas principalmente em regiões perivasculares associadas à regularidade de colágeno. Ao considerarmos a região da pele, foi possível observar uma tendência de associação entre os dois parâmetros em pele de orelha (Fisher's exact test P Value = 0,057) (Figura 4.60A).

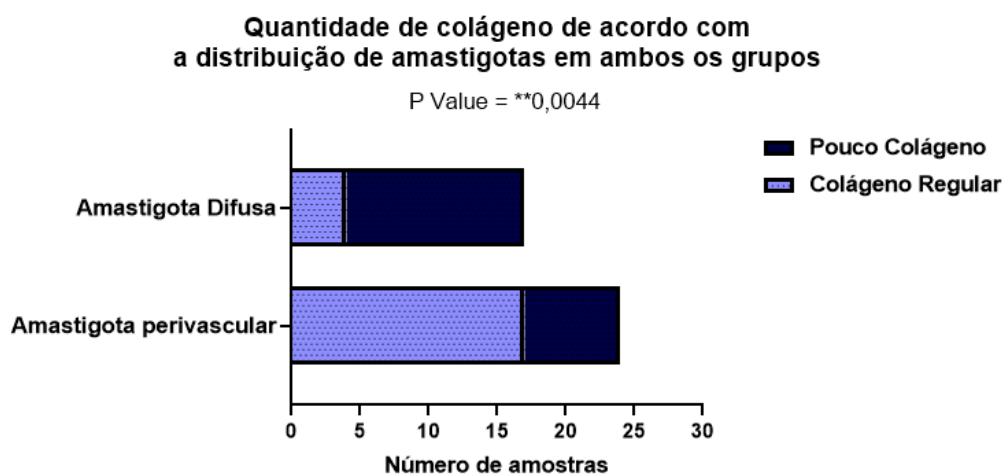
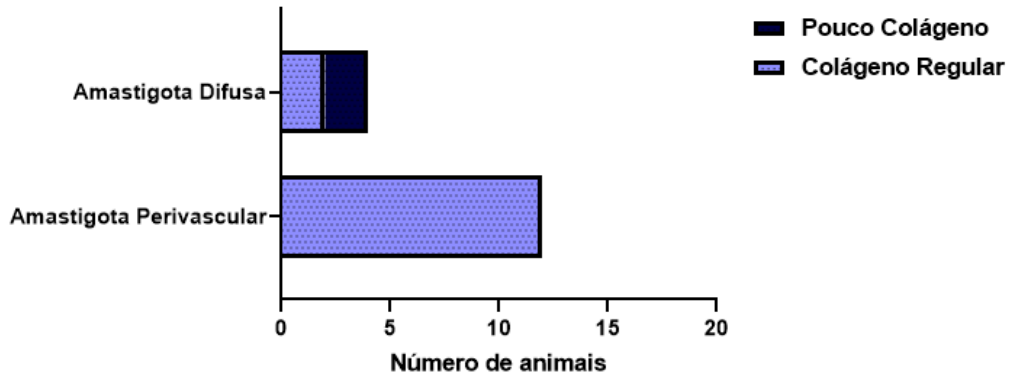


Figura 4.58 - Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a distribuição de amastigotas. Fisher's exact test.

A
Quantidade de colágeno de acordo com a distribuição de amastigotas em cães assintomáticos

P Value = 0,050



B
Quantidade de colágeno de acordo com a distribuição de amastigotas em cães sintomáticos

P Value = 0,20

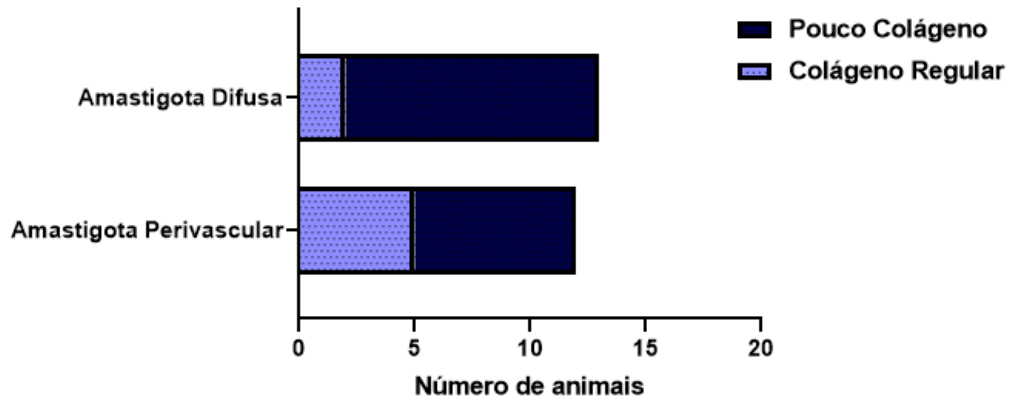
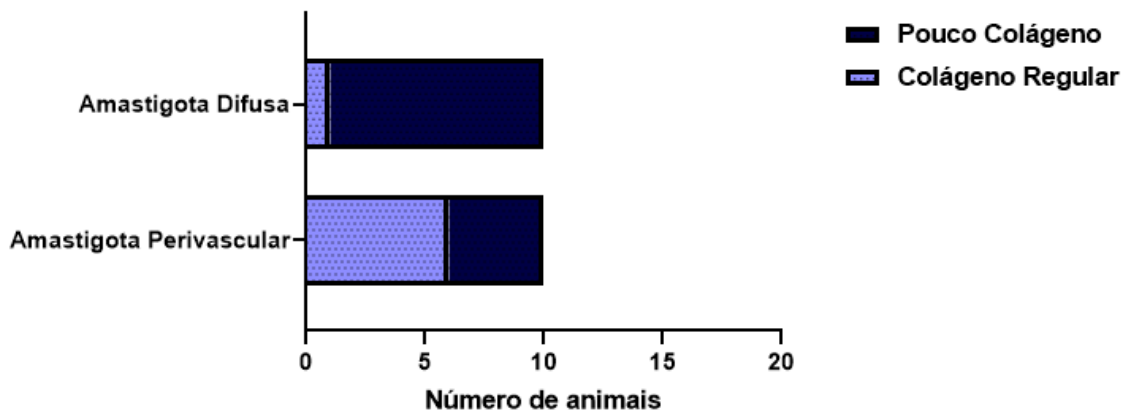


Figura 4.59 - Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a distribuição de amastigotas. A: Cães assintomáticos. B Cães sintomáticos. Fisher's exact test.

A
Quantidade de colágeno de acordo com a distribuição de amastigotas em pele de orelha

P Value = 0,057



B Quantidade de colágeno de acordo com a distribuição de amastigotas em pele de abdômen

P Value = 0,15

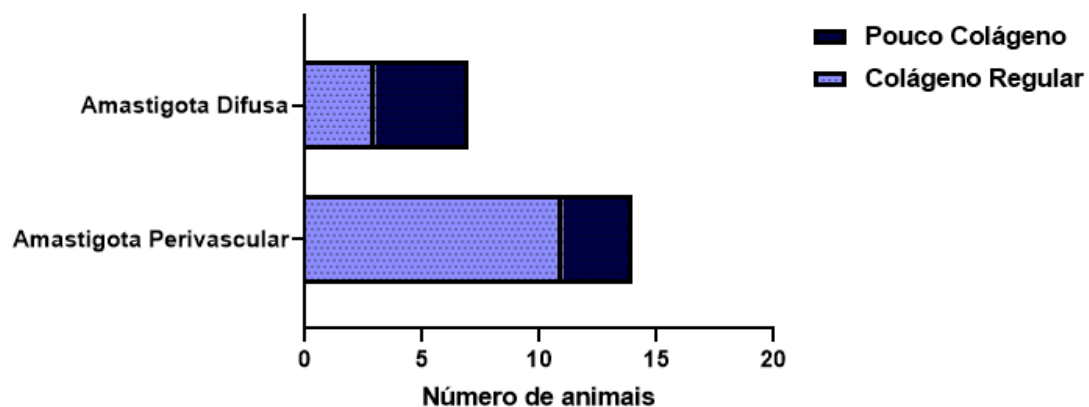


Figura 4.60 - Quantidade de colágeno em pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* de acordo com a distribuição de amastigotas. A: Pele de orelha. B Pele de abdômen. Fisher's exact test.

5 Discussão

Nesse estudo, procuramos uma melhor compreensão da relação entre as alterações vasculares presentes na pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e a persistência parasitária, disseminação do parasito pela pele e os sinais clínicos característicos de LVC observados. Cães sintomáticos podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas (Baneth *et al.*, 2008). Dessa forma, ao analisar os sinais clínicos de treze cães sintomáticos, a onicogribose e a dermatite foram os sinais clínicos observados com maior frequência, concordando com os resultados de da Silva *et al.*, 2018.

A alta frequência do acometimento da pele em cães com LVC já foi demonstrada por Meléndez-Lazo *et al.* (2018), que observaram que dentre os sinais clínicos gerais apresentados pelos animais, as manifestações cutâneas estavam presentes em 78.4% dos cães. Ao analisar as manifestações clínicas dermatológicas apresentadas pelos animais, a dermatite foi o sinal clínico dermatológico mais frequente, seguida por alopecia e descamação. Assim, as lesões de pele em cães com LVC representam importantes sinais clínicos e vem sendo estudadas por vários autores (Ordeix *et al.*, 2017; Solano-Gallego *et al.*, 2004; Ordeix *et al.*, 2005; Ciaramella *et al.*, 1997) sendo a dermatite considerada uma das principais manifestações clínico-patológicas da LVC (Saridomichelakis e Koutinas., 2014).

A análise histopatológica de cães com LVC geralmente revela um infiltrado inflamatório crônico granulomatoso com a presença de parasitos no interior de macrófagos (Baneth *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que cada apresentação clínica dermatológica apresenta seus próprios padrões de lesões microscópicas individuais que acometem várias estruturas do tecido cutâneo (Saridomichelakis e Koutinas., 2014). Além de serem observadas em fragmentos de pele lesionadas, reações inflamatórias microscópicas também podem ser observadas em cortes de pele clinicamente saudáveis. Ao analisar microscopicamente os fragmentos de pele sem lesões ao exame clínico, Ordeix *et al.* (2017) observaram infiltrado inflamatório de forma mais branda e localizado em regiões perivasculares à intersticiais com a presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Em nosso estudo, analisando os fragmentos de pele de acordo com a sintomatologia clínica, a menor intensidade do infiltrado inflamatório foi observada em animais sem sinais clínicos. Esse cães, em sua maioria, apresentaram infiltrado inflamatório localizado principalmente em regiões perivasculares.

Ao avaliar a intensidade do infiltrado inflamatório em diferentes regiões do corpo, Jacintho *et al.* (2018) observaram maior intensidade de infiltrado em fragmentos de pele de orelha e menor intensidade de infiltrado inflamatório em fragmentos provenientes do abdômen.

Assim, foi realizada uma análise histopatológica comparativa entre a pele de orelha e abdômen de cães assintomáticos e sintomáticos levando em consideração a intensidade e distribuição do infiltrado celular, tendo este estudo servido como referência para o desenho do presente trabalho.

No presente estudo, observamos que a pele de orelha apresentou maior intensidade de infiltrado inflamatório em comparação com a pele de abdômen, concordando com os resultados de Jacintho *et al.* (2018). Além disso foi possível observar infiltrado inflamatório acometendo regiões mais extensas na derme em fragmentos de pele de orelha.

A presença do infiltrado inflamatório granulomatoso pode ser observado em diferentes manifestações cutâneas em cães com LVC (Saridomichelakis e Koutinas, 2014). Dessa forma, avaliamos a presença ou ausência de reações granulomatosas de acordo com a sintomatologia clínica e o fragmento de pele analisado. Observamos que além da presença de um infiltrado celular mais intenso, também foi observada maior intensidade de reações granulomatosas em pele de orelha em comparação a pele de abdômen. O infiltrado inflamatório granulomatoso foi visto com maior frequência em animais que apresentaram manifestações clínicas mais intensas de LVC discordando dos resultados de Esteve *et al.* (2015). Nas amostras de nosso trabalho, a formação de reação granulomatosa estava associada com a maior intensidade e distribuição mais difusa do infiltrado inflamatório.

Ao avaliarmos a carga parasitária, a média de parasitos observada em pele de orelha foi maior em comparação da média observada em pele de abdômen. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o número de parasitos de acordo com a região de pele analisada. Na orelha, a carga parasitária se manteve elevada em ambos os grupos (sintomáticos ou não) o que nos leva a pensar que a disseminação do parasito pela pele da orelha seja mais facilitada do que na pele do abdômen. Isto pode ser devido a orelha ser uma área mais exposta para o inseto vetor ou mesmo por diferenças anatômicas relacionadas a vascularização.

Fragmentos de pele sem lesões ao exame clínico tem sido alvos de vários estudos (Xavier *et al.*, 2006; Borja *et al.*, 2016; Saridomichelakis e Koutinas., 2014). Borja *et al.* (2016) mostraram que não há uma associação entre a carga parasitária na pele e o desenvolvimento de sinais clínicos, e que a capacidade de transmissão do parasito ao vetor por xenodiagnóstico é dependente da intensidade de carga parasitária presente na pele. Tem sido descrito que os cães possuem um importante papel na manutenção do ciclo de transmissão da *Leishmania* ao vetor (Laurenti *et al.*, 2013). Em nosso estudo, a manutenção da alta carga parasitária na pele de orelha, independente de sinais clínicos, sugere que a orelha seja um importante local fonte de

infecção para os flebotomíneos e uma boa região para a coleta de amostras clínicas para citologia e identificação do parasito.

Jacinto et al. (2018) mostraram que a carga parasitária pode apresentar variações de acordo com o local de análise. Ao avaliar a carga parasitária em diferentes regiões do corpo de cães com LVC, Jacinto *et al.*, 2018, observavam maior número de parasitos em fragmentos de pele de orelha e focinho, enquanto na pele de abdômen a carga parasitária foi observada em menor intensidade. Em nosso estudo, formas amastigotas de *Leishmania* foram observadas em maior frequência em fragmentos de pele de orelha de cães com sintomatologia clínica. Em relação à distribuição das amastigotas na pele, estas podiam ser observadas difusamente distribuídas pela derme, porém estavam localizadas principalmente ao redor do plexo vascular dérmico. Além disso, foi possível observar formas amastigotas de *Leishmania* parasitando células endoteliais e perivasculares, como observado também por Tarantino *et al.* (2001).

De forma interessante, amastigotas de *Leishmania* foram ainda observadas no interior de vasos sanguíneos, indicando uma possível via de disseminação do parasito para a pele através da vascularização dérmica sanguínea. Apesar dos dados observados na literatura, a correlação entre a carga parasitária e a vascularização dérmica não está muito bem elucidada. Entretanto, a visualização de amastigotas parasitando regiões perivasculares poderia indicar que a presença de carga parasitária na pele ocorra através de uma disseminação hematogênica (Koutinas e Koutinas, 2014). Lugo-Yarbu *et al.* (2003) demonstraram antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na superfície de células endoteliais e livres na luz de microcapilares dérmicos. Dessa forma, os vasos sanguíneos podem estar envolvidos em processos infecciosos por protozoários participando da imunidade inata e adaptativa e da disseminação dos parasitos pelo organismo hospedeiro (Varikuti *et al.*, 2020). Durante a infecção por *Leishmania*, o endotélio vascular desempenha um importante papel. Estudos de Hassan *et al.* (1995) demonstraram a expressão de MHC classe II em células endoteliais durante a infecção por *L. major*. Assim, as células endoteliais podem atuar como células apresentadoras de antígenos para linfócitos T CD4 de memória e efetoras estimulando a produção de IFN- γ e a polarização de células T para um perfil Th1 (Varikuti *et al.*, 2020).

Dessa forma, avaliamos a associação entre a distribuição da carga parasitária e a intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório. Observamos em nosso estudo, que quanto maior a intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório maior é a dispersão parasitária pela derme. Em animais sintomáticos, além das regiões perivasculares, as amastigotas eram também visualizadas de forma difusa na derme. Esta maior dispersão pelo tecido está associada à presença de infiltrado inflamatório mais intenso e afetando áreas mais extensas, enquanto a localização de amastigotas restrita a região perivascular se associa com a intensidade mais

branda do infiltrado inflamatório dérmico em animais assintomáticos. A correlação entre o infiltrado inflamatório e a presença de amastigotas também foi observada por Moura et al. (2008).

Durante processos inflamatórios, os vasos sanguíneos participam ativamente no processo de migração de células para o tecido lesionado. No início da fase inflamatória, células endoteliais liberam óxido nítrico (NO), prostaciclina-2 (prostaglandina I₂ ou PGI₂) e endotelina-1, tendo como consequência a vasodilatação através do relaxamento de células musculares lisas circundantes (Varikuti *et al.*, 2020). Em pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada, a dilatação vascular com a presença de parasitos em seu lúmen, já foi observada (Lugo-Yarbuh *et al.*, 2003). O aumento da permeabilidade vascular, a dilatação de vasos sanguíneos e o recrutamento de células do sistema imune para o local da lesão constituem um importante mecanismo da resposta inflamatória (Medeiros e Dantas Filho, 2016). Portanto, no presente trabalho, avaliamos a dilatação dos vasos sanguíneos dérmicos em fragmentos de pele de orelha e abdômen de acordo com a sintomatologia clínica. Observamos maior dilatação vascular em pele de orelha do que na de abdômen, sendo mais evidente em cães sintomáticos.

Durante o processo de recrutamento de células para o sítio de lesão, a dilatação de capilares sanguíneos torna o fluxo sanguíneo mais lento, permitindo assim, a marginação de leucócitos e a ligação entre ligantes de E- e P-selectinas expressos nos leucócitos e às selectinas nas células endoteliais (Abbas, 2015). Dessa forma, devido a importância entre a dilatação vascular e a migração de células para o tecido, avaliamos a associação entre a dilatação vascular presente em pele de orelha e abdômen e a intensidade do infiltrado inflamatório presente na derme. Em nosso estudo, foi possível observar associação entre a dilatação dos vasos sanguíneos dérmicos e a intensidade e presença do infiltrado inflamatório. Assim, cães que apresentaram maior intensidade de infiltrado inflamatório, possuíam maior diâmetro vascular, enquanto cães que apresentavam menor diâmetro, possuíam o infiltrado inflamatório mais restrito à regiões perivasculares.

Como foi demonstrado em nossos resultados anteriores, há uma associação entre a carga parasitária e a intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório. Assim, avaliamos se a dilatação vascular poderia estar associada com a presença de carga parasitária na pele. Ao avaliar a correlação entre o número de amastigotas presentes na pele e o diâmetro dos vasos sanguíneos dérmicos, não foi possível observar correlação entre estes dois parâmetros. Além disso, a associação entre a distribuição da carga parasitária e a dilatação vascular também não foi observada. No entanto, observamos uma associação entre o número de amastigotas e o número de vasos dérmicos.

Durante o processo inflamatório é comum observar o aumento do número de vasos sanguíneos, processo denominado angiogênese. A família VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular) é constituída por proteínas envolvidas no remodelamento vascular através da proliferação de células endoteliais e angiogênese formando novos vasos sanguíneos (Siafakas *et al.*, 2007). Durante a infecção por *Leishmania*, baixos níveis de oxigênio são observados no tecido infectado devido à alta demanda de O₂ pelo alto influxo de células do sistema imune para o local (Schatz *et al.*, 2018). Assim, níveis baixos de oxigênio são considerados estímulos importantes para o crescimento de novos capilares a partir de veias pré-existentes na região lesionada (Castro, JLC *et al.*, 2015). Estudos com *L.major* demonstraram que o parasito é capaz de induzir a ativação do fator de transcrição fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α), o qual induz a expressão do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) (Weinkopff *et al.*, 2019). Além disso, Weinkopff *et al.* (2019) observaram altos níveis de VEGF-A e seu receptor na pele de orelha de camundongos infectados por *L. major*, e os macrófagos foram as principais células produtoras de VEGF-A e HIF-1 α .

Dessa forma, analisamos o número de vasos sanguíneos dérmicos em fragmentos de pele de orelha e abdômen de acordo com a sintomatologia clínica. Em nosso estudo, independente das manifestações clínicas observadas, a pele da orelha apresentou maior número de vasos sanguíneos em comparação com a pele de abdômen. Além disso, foi possível observar associação entre o número de vasos sanguíneos e a intensidade do infiltrado inflamatório. Com isso, animais que apresentam maior número de vasos sanguíneos dérmicos, apresentam infiltrado inflamatório mais intenso, indicando que assim como o diâmetro vascular, o aumento do número de vasos sanguíneos também contribui para a chegada de células para o tecido e possivelmente parasitos.

Alguns autores sugerem a disseminação hematogênica do parasito pela pele (Koutinas e Koutinas, 2014; Ordeix *et al.*, 2017; Solano-Gallego *et al.*, 2004), e por este motivo, avaliamos se o aumento do número de vasos sanguíneos dérmicos está correlacionado com a presença e com o aumento da carga parasitária no tecido. Neste sentido, foi possível observar em nosso estudo uma correlação positiva entre o número de amastigotas presentes na derme e o número de vasos sanguíneos, demonstrando um possível papel da vascularização dérmica no aumento da carga parasitária. Considerando de forma individual a região de pele analisada, foi possível observar correlação entre estes dois parâmetros somente em pele de orelha. Esta correlação em pele de orelha pode ser explicada de duas formas: 1- por diferenças anatômicas na vascularização das diferentes regiões do corpo sendo a orelha mais vascularizada do que o abdomen; ou 2- por ser a pele de orelha mais exposta à picada dos flebotomíneos, já que tem menor cobertura de pelos, levando à estímulos repetidos e alterações vasculares mais intensas.

Outro fator importante associado à disseminação e persistência parasitária na pele são alterações nas fibras de colágeno dérmico, os quais podem favorecer a migração de macrófagos parasitados para os vasos sanguíneos (Jacintho *et al.*, 2018). O colágeno tipo I é um dos principais componentes da matriz extracelular da pele, os quais são substituídos por colágeno tipo III durante a infecção crônica (de Menezes *et al.*, 2016). Dessa forma, a redução do colágeno tipo I e aumento do colágeno tipo III é observado durante a infecção por *Leishmania* em cães (Giunchetti *et al.*, 2006). Além disso, estudos de Giunchetti *et al.* (2006), demonstraram alterações em fibras de colágeno de cães com alto escore clínico. Assim, realizamos uma análise da quantidade de colágeno dérmico de acordo com a sintomatologia clínica. Observamos que cães sintomáticos apresentaram menor quantidade de colágeno na derme em comparação com cães sem sintomatologia clínica, concordando com os resultados de Giunchetti *et al.*, 2006.

Ao avaliar a redução de colágeno em pele de diferentes regiões do corpo, Jacintho *et al.* (2018) observaram maior expressão de enzimas degradantes de matriz extracelular metaloproteinases (MMPs) na região da orelha e focinho de cães com LVC. Enquanto em pele de abdômen a expressão de MMPs não apresentou diferenças significativas ao comparar com o grupo controle. Assim, realizamos uma análise qualitativa da quantidade de colágeno dérmico em fragmentos de pele de orelha e abdômen. Observamos que a pele de abdômen apresentou maior regularidade da quantidade de colágeno em comparação com a pele da orelha, o qual demonstrou menor quantidade de colágeno concordando com os resultados de Jacintho *et al.* (2018).

No presente estudo, observamos uma associação entre a intensidade do infiltrado inflamatório e a redução de colágeno na derme. Estes dados estão de acordo com o trabalho de Jacintho *et al.* (2018) que observaram que animais com infiltrado inflamatório mais intenso, possuíam maior degradação das fibras de colágeno. Assim, cães que apresentavam maior regularidade de colágeno, em sua maioria, apresentavam infiltrado inflamatório com variação de ausente a leve, enquanto cães que apresentavam menor quantidade de colágeno, apresentavam maior intensidade de infiltrado inflamatório.

Ainda, ao avaliar a associação entre a distribuição do infiltrado inflamatório e a redução de colágeno dérmico, cães que apresentavam menor quantidade de colágeno dérmico, em sua maioria, apresentavam infiltrado inflamatório distribuído de forma mais difusa pelo tecido. Considerando individualmente a região de pele, só foi possível observar significância estatística quando a pele de orelha era avaliada. Apesar disso, em fragmento de pele de abdômen que apresentavam infiltrado inflamatório difuso, foi possível observar menor quantidade de colágeno dérmico.

Além disso, observamos uma associação entre a quantidade de colágeno dérmico e o número de amastigotas presentes na pele, as quais estavam em número mais elevado em fragmentos de pele que apresentavam menor quantidade de colágeno. Avaliando os fragmentos de pele de regiões diferentes individualmente, foi possível observar esta associação somente em pele de orelha. Em adição, foi possível observar associação entre a quantidade de colágeno dérmico e a distribuição de amastigotas pela pele. Dessa forma, animais que possuíam amastigotas localizadas principalmente em regiões perivasculares, apresentam maior regularidade de colágeno, enquanto menor quantidade de colágeno no tecido aparenta favorecer a distribuição de amastigotas pela pele.

Em cães com LVC, já foi demonstrada a dissociação das fibras de colágeno dérmicas em fragmentos de pele que apresentavam maior carga parasitária. Tal dissociação ocorreu como consequência da distribuição difusa do infiltrado inflamatório granulomatoso (Jacintho *et al.*, 2018). Em contrapartida, a dissociação do colágeno dérmico favorece ainda mais o recrutamento de células para o sítio de lesão, e consequentemente a disseminação dos parasitos, que estão no interior das células inflamatórias, pela pele.

Em conjunto, esses resultados sugerem uma relação entre a vascularização dérmica e a disseminação parasitária principalmente em pele de orelha. A correlação entre a carga parasitária e o número de vasos sanguíneos dérmicos indica uma importante participação da vascularização dérmica no aumento do número de amastigotas no tecido. Dessa forma, o maior número de vasos sanguíneos em pele de orelha de cães com LVC, poderia favorecer o aumento da carga parasitária local. Além disso, uma maior intensidade do infiltrado inflamatório em pele de orelha, em associação com a menor quantidade de colágeno observada, poderia favorecer a distribuição de amastigotas pela derme.

Como o número de amastigotas observados em pele de orelha foi elevado e semelhante entre cães assintomáticos e sintomáticos, a pele de orelha demonstrou ser um interessante local para a coleta de amostras clínicas para o diagnóstico de LVC devido à alta probabilidade de detecção de amastigotas. Além disso, a pele de orelha demonstrou ser uma importante fonte de infecção para o vetor.

Uma análise comparativa resumida entre os dados observados em fragmentos de pele de orelha e abdômen, podem ser observados na Figura 5.0.

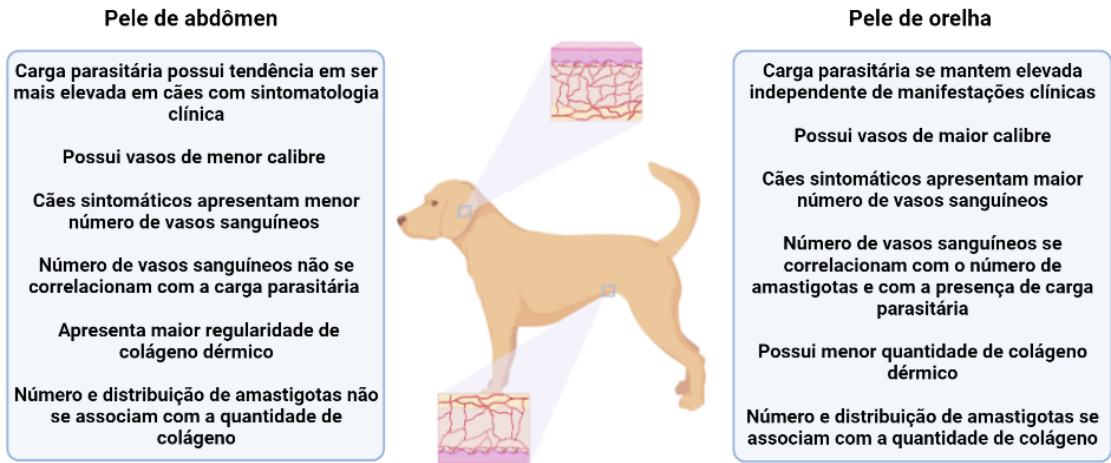


Figura 5.0 - Diferenças observadas em fragmentos de pele de orelha e abdômen de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L.infantum*.

6 Conclusões

- ✓ As lesões de pele e anexos são manifestações frequentemente observadas em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, e podem ocorrer como consequência do aumento da vascularização dérmica, da intensidade do infiltrado inflamatório, assim como pela maior distribuição parasitária pela pele de cães sintomáticos.
- ✓ A pele de orelha apresenta maior intensidade de infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos apresentando maior diâmetro, indicando a possível participação de fatores de ativação endotelial devido ao processo inflamatório.
- ✓ A pele de orelha apresenta maior número de vasos sanguíneos em comparação com a pele de abdômen, sugerindo estimulação de fatores angiogênicos nessa região
- ✓ A correlação entre o número de vasos sanguíneos e o número de amastigotas e a associação com a presença de carga parasitária indica que é possível que a vascularização dérmica desempenhe um importante papel na disseminação e persistência parasitária na pele. Assim como a visualização de amastigotas dentro de vasos sanguíneos dérmicos indica a chegada do parasito ao tecido através dessa via.
- ✓ A menor quantidade de colágeno dérmico em associação com maior intensidade de infiltrado inflamatório poderiam favorecer a migração dos parasitos dos vasos sanguíneos para a derme e vice-versa.
- ✓ A associação entre a quantidade de colágeno e a disseminação parasitária indica que a menor quantidade de colágeno poderia contribuir para a disseminação parasitária pela pele.
- ✓ Os resultados indicam que a presença de carga parasitária em pele de orelha resulta no aumento do processo inflamatório, o qual pode criar um ambiente de hipóxia, levando a produção de fatores angiogênicos, que promovem a proliferação vascular. Como consequência, ocorre a chegada de mais células para o tecido e o aumento da carga parasitária no local, tornando o parasito cada vez mais acessível ao vetor (Figura 6.0).

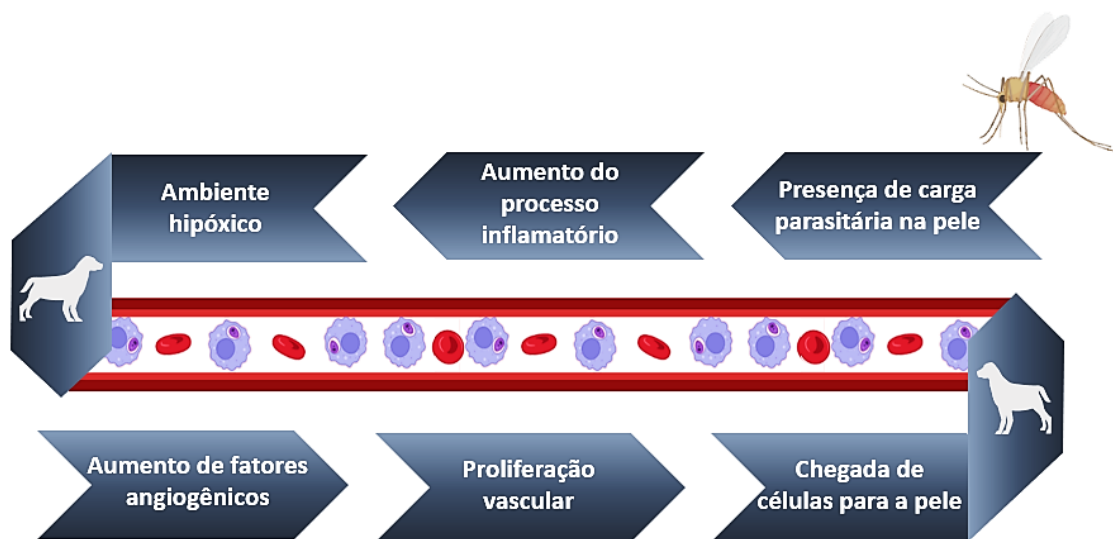


Figura 6.0 - Esquematização da associação entre as alterações vasculares durante o processo inflamatório e a presença de carga parasitária em pele de orelha.

7 Referências

- Abbas, A. K et al. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 8ª ed. 2015
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004349. doi:10.1371/journal.pntd.0004349
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends Microbiol*. 1998;6(10):392-401. doi:10.1016/s0966-842x(98)01324-
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 2008;24(7):324-330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001
- Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007;37(10):1097-1106. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- Boechat VC, Pereira SA, Júnior AAVM, et al. Frequency, active infection and load of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract of male and female dogs. *PLoS One*. 2020;15(9):e0238188. Published 2020 Sep 1. doi:10.1371/journal.pone.0238188
- Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4):e1019. Published 2011 Apr 12. doi:10.1371/journal.pntd.0001019
- Borja LS, Sousa OMF, Solcà MDS, et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet Parasitol*. 2016;229:110-117. doi:10.1016/j.vetpar.2016.10.004
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral– Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- Camargo-Neves VL, Katz G, Rodas LA, et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São

Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad Saude Publica*. 2001;17(5):1263-1267. doi:10.1590/s0102-311x2001000500026

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997;141(21):539-543. doi:10.1136/vr.141.21.539

Colville, T. P.; Bassert, J.M. Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária. Rio de Janeiro, 2ª edição, Ed. Elsevier, 2010

Courret N, Fréhel C, Gouhier N, et al. Biogenesis of Leishmania-harboured parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 11):2303-2316.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasit Vectors*. 2009;2 Suppl 1(Suppl 1):S1. Published 2009 Mar 26. doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S1

de Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit Vectors*. 2016 May 4;9:264. doi: 10.1186/s13071-016-1540-3.

Desjeux P. Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(9):692. doi:10.1038/nrmicro981

de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*. 2006;137(1-2):159-167. doi:10.1016/j.vetpar.2005.12.011

Dostálová A, Volf P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. 2012;5:276.. doi:10.1186/1756-3305-5-276

ElHassan AM, Gaafar A, Theander TG. Antigen-presenting cells in human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Exp Immunol* 1995;99:445–53.

Esteve LO, Saz SV, Hosein S, Solano-Gallego L. Histopathological findings and detection of Toll-like receptor 2 in cutaneous lesions of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2015;209(3-4):157-163. doi:10.1016/j.vetpar.2015.03.004

Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*. 1988;44(2):194-196.

Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):834-42. doi: 10.1038/nature05659.

Getty, R. Sisson and Grossman's The Anatomy of the Domestic Animals. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 5a ed., 1975.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol.* 2006;135(2-3):100-107. doi:10.1016/j.jcpa.2006.06.005

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol.* 2003;33(10):1027-1034. doi:10.1016/s0020-7519(03)00142-5

Guimarães-Costa AB, Rochael NC, Oliveira F, Echevarria-Lima J, Saraiva EM. Neutrophil Extracellular Traps Reprogram IL-4/GM-CSF-Induced Monocyte Differentiation to Anti-inflammatory Macrophages. *Front Immunol.* 2017;8:523. Published 2017 May 17. doi:10.3389/fimmu.2017.00523

Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. doi:10.1073/pnas.0900226106.

Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(6):687-725. doi:10.4269/ajtmh.1989.41.687

Jacinto APP, Melo GD, Machado GF, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2018;117(6):1819-1827. doi:10.1007/s00436-018-5868-9

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pinelli E, et al. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite.* 1994;1(4):311-318. doi:10.1051/parasite/1994014311

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argiriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1999;35(5):376-383. doi:10.5326/15473317-35-5-376

Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol.* 2013;196(3-4):296-300. doi:10.1016/j.vetpar.2013.03.017

Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:83. Published 2012 Jun 12. doi:10.3389/fcimb.2012.00083

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Chicharro C, Solano-Gallego L. Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent

of the infection and treatment outcome. *Parasit Vectors*. 2014;7:120. Published 2014 Mar 24. doi:10.1186/1756-3305-7-120

Lugo-Yarbu A, Valera M, Alarcón M, et al. Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in vascular endothelium lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Investigacion Clinica*. 2003 Mar;44(1):61-76.

McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol*. 2007;23(8):368-375. doi:10.1016/j.pt.2007.06.009

Medeiros AC, Dantas-Filho AM. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *J Surg Cl Res [Internet]*. 2017Mar.2 [cited 2021Nov.10];7(2):87-102.

Meléndez-Lazo A, Ordeix L, Planellas M, Pastor J, Solano-Gallego L. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Res Vet Sci*. 2018;117:18-27. doi:10.1016/j.rvsc.2017.10.011

Moura,E.P.,Ribeiro,R.R.,Sampaio,W.M.,Lima,W.G.,Alves,C.F.,MeloF.A.,Melo,M. N.,Tafuri,W.L.,Tafuri,W.L.,Michalick,M.S.M.,2008. Histopathological and parasitological analysis of skin tissues biop-sies from two distinct anatomical áreas of the ears of dogs natural infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Braz. J. Vet. Pathol*. 1(1),10–15.

Ordeix L, Dalmau A, Osso M, Llull J, Montserrat-Sangrà S, Solano-Gallego L. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):121. Published 2017 Mar 13. doi:10.1186/s13071-017-2051-6

Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania spp.* infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet Dermatol*. 2005;16(3):187-191. doi:10.1111/j.1365-3164.2005.00454.x

Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019.

Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, Fytianou A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol*. 2005 Apr 8;104(3-4):227-37. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.12.001.

Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1395-1405. doi:10.1016/s0020-7519(00)00141-7

Pereira M, Valério-Bolas A, Santos-Mateus D, et al. Canine neutrophils activate effector mechanisms in response to *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2017;248:10-20. doi:10.1016/j.vetpar.2017.10.008

Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 2015;10(1):111-29. doi: 10.2217/fmb.14.103

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2001 May 1;183(9):1421-4.

Richmond JM, Harris JE. Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Dec 1;4(12):a015339. doi: 10.1101/cshperspect.a015339.

Roque e Jansen. Leishmaniose do continente americano. 1° edição. Autores: Conceição-Silva & Alves. C. R. 2014. . Capítulo 14. Pagina 234.

Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol.* 2009 Oct;20(5-6):471-89. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00823.x.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Dermatol.* 2014;25(2):61-e22. doi:10.1111/vde.12105

Schatz V, Neubert P, Rieger F, Jantsch J. Hypoxia, Hypoxia-Inducible Factor-1 α , and Innate Antileishmanial Immune Responses. *Front Immunol.* 2018;9:216. Published 2018 Feb 22. doi:10.3389/fimmu.2018.00216

Schwarz R, Le Roux JM, Schaller R, Neurand K. Micromorphology of the skin (epidermis, dermis, subcutis) of the dog. *Onderstepoort J Vet Res.* 1979;46(2):105-109.

Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 18;18(6):1296. doi: 10.3390/ijms18061296.

Scorza, B. M., Mahachi, K. G., Cox, A. C., Toepp, A. J., Leal-Lima, A., Kumar Kushwaha, A., Kelly, P., Meneses, C., Wilson, G., Gibson-Corley, K. N., Bartholomay, L., Kamhawi, S., & Petersen, C. A. (2021). *Leishmania infantum* xenodiagnosis from vertically infected dogs reveals significant skin tropism. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(10), e0009366. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009366>

Serafim TD, Coutinho-Abreu IV, Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat Microbiol.* 2018 May;3(5):548-555. doi: 10.1038/s41564-018-0125-7. Epub 2018 Mar 19.

Siafakas NM, Antoniou KM, Tzortzaki EG. Role of angiogenesis and vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2007;2(4):453-462.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2009 Mar 9;160(1-2):55-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.079.

Slatter, D.H. Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. ed. Manole, 2003. JONES, Thomas Carlyle; HUNT, Ronald Duncan; KING, Norval W. (ed) Patologia Veterinária. 6ed, Manole, 2000

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2009 Oct 28;165(1-2):1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2011;4:86. Published 2011 May 20. doi:10.1186/1756-3305-4-86.

Solano-Gallego, L.; Fernandezbellon, H.; Morell, P. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of leishmania infantum-infected Dogs. *J. Comp. Pathol.*, v.130, p.7-12, 2004.

Solbach W, Laskay T. The host response to Leishmania infection. *Adv Immunol*. 2000;74:275-317. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60912-8.

Spellberg B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci*. 2000;67(5):477-502. doi:10.1016/s0024-3205(00)00653-6

Tarantino C, Rossi G, Kramer LH, Perrucci S, Cringoli G, Macchioni G. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. *Vet Parasitol*. 2001;102(1-2):77-83. doi:10.1016/s0304-4017(01)00518-0

Taylor, M. A., Coop, R. L., Wall, R. L. *Veterinary Parasitology* 3rd Edition, 2007.

Tempone. A.J; Pitaluga. A.N; Traub-Csekö. Y.M. Leishmaniose do continente americano. 1º edição. Autores: CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES. C. R. 2014. Capítulo 9. Pagina 160.

Tizard, Ian R. *Imunologia Veterinária*, 9ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2014 Swenson, M.J.;Reece, W.O. *Dukes: fisiologia dos animais domésticos*. 11a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996

Tobias, K.M.; Johnston, S.A. *Veterinary surgery small animal*. 2.V. St. Louis: Elsevier. 2012.

Toepp AJ, Petersen CA. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Res Vet Sci*. 2020 Jun;130:19-25. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.02.004.

Thomsett LR. Structure of canine skin. *Br Vet J*. 1986 Mar-Apr;142(2):116-23. doi: 10.1016/0007-1935(86)90086-2.

Torres-Neto, R. et al. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 29, n. 3, p. 667-676, 2008.

Urquhart, G.M.; Armour, J.; Duncan, J.L.; Jennings, F.W. *Parasitologia Veterinária*, 2 ed. Rio de Janeiro, 1998.

Varikuti S, Jha BK, Holcomb EA, et al. The role of vascular endothelium and exosomes in human protozoan parasitic diseases. *Vessel Plus*. 2020;4:28. doi:10.20517/2574-1209.2020.27

Verçosa BL, Melo MN, Puerto HL, Mendonça IL, Vasconcelos AC. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. *Vet Parasitol*. 2012;189(2-4):162-170. doi:10.1016/j.vetpar.2012.04.035.

Vilela. M; Afonso. M. M; Costa. S. M; Costa. W. A; Rangel. E. F. Leishmaniose do continente americano. 1º edição. Autores: Conceição-Silva & Alves. C. R. 2014. Parte IV. Capítulo 10. Pagina 183.

Weinkopff T, Roys H, Bowlin A, Scott P. *Leishmania* Infection Induces Macrophage Vascular Endothelial Growth Factor A Production in an ARNT/HIF-Dependent Manner. *Infect Immun*. 2019;87(11):e00088-19. Published 2019 Oct 18. doi:10.1128/IAI.00088-19

World Health Organization, Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap, WER No. 35, 2021, 96, 401–419

World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva; 2010.

Xavier, S.C. et al . Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte , v. 58, n. 6, p. 944-1000, Dec. 2006.

8 Anexos

Tabela 8.0 - Resumo dos resultados observados

Parâmetros avaliados	Assintomáticos		Sintomáticos		Ambos os grupos	
	Orelha	Abdômen	Orelha	Abdômen	Orelha	Abdômen
Intensidade do infiltrado inflamatório	76.9%	100%	7.7%	53.8%	42.3%	76.9%
	Ausente a leve	Ausente a leve	Ausente a leve	Ausente a leve	Ausente a leve	Ausente a leve
Distribuição do infiltrado inflamatório	30%	0 Difuso	91%	70%	61.9%	53.8%
	Difuso		Difuso	Difuso	Difuso	Difuso
Frequência de reação granulomatosa	15.3%	0	61.5%	46.1%	38.6%	23%
Associação entre a frequência de reação granulomatosa e intensidade do infiltrado inflamatório	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Associação entre a frequência de reação granulomatosa e distribuição do infiltrado inflamatório	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
Número de amastigotas (média por campo)	0.57	0.28	1.14	0.8	0.85	0.54
Distribuição de amastigotas	28.5%	22.2%	61.5%	41.6%	50%	33.3%
	Difusa	Difusa	Difusa	Difusa	Difusa	Difusa
Associação entre distribuição de amastigotas e intensidade do infiltrado inflamatório	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Associação entre distribuição de amastigotas e distribuição do infiltrado inflamatório	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
Diâmetro vascular (média por campo)	8.36	6.58	11.76	7.27	10.06	6.92

Associação entre o diâmetro vascular e intensidade do infiltrado inflamatório	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Associação entre o diâmetro vascular e a presença do infiltrado inflamatório	Não	Não	Variável insuficiente	Variável insuficiente	Não	Não
Correlação entre o diâmetro vascular e o número de amastigotas	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Correlação entre o diâmetro vascular e a distribuição de amastigotas	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Número de vasos sanguíneos (média por campo)	4.12	3,8	4.89	3.7	4.50	3,75
Associação entre o número de vasos sanguíneos e a intensidade do infiltrado inflamatório	Não	N insuficiente	N insuficiente	Não	Não	Não
Correlação entre o número de vasos sanguíneos e o número de amastigotas	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não
Correlação entre o número de vasos sanguíneos e a presença de amastigotas	Sim	Não	Variável insuficiente	Variável insuficiente	Sim	Não
Quantidade de colágeno	84.6% Regular	92.3% Regular	23% Regular	53.8% Regular	53.8% Regular	73% Regular
Associação entre a quantidade de colágeno e a intensidade do infiltrado inflamatório	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim
Associação entre a quantidade de colágeno e a distribuição do infiltrado inflamatório	Não	Não	Não	Não	Sim	Não

Associação entre a quantidade de colágeno e o número de amastigotas	Não	Variável insuficiente	Não	Não	Sim	Não
Associação entre a quantidade de colágeno e a distribuição de amastigotas	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não