

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina

**ANÁLISE HISTOLÓGICA, PARASITOLÓGICA E MORFOMÉTRICA
DA PELE DE ORELHA DE CÃES NATURALMENTE E
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania*
*(Leishmania) chagasi***

Maria Marta Figueiredo

Belo Horizonte
Fevereiro de 2009

Maria Marta Figueiredo

**ANÁLISE HISTOLÓGICA, PARASITOLÓGICA E MORFOMÉTRICA
DA PELE DE ORELHA SÃ DE CÃES NATURALMENTE E
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri

Belo Horizonte

19 de fevereiro de 2009



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **MARIA MARTA FIGUEIREDO**, nº de registro 2007652425. Às quatorze horas do **dia dezenove do mês de fevereiro de dois mil e nove**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ANÁLISE HISTOLÓGICA, PARASITOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DA PELE DE ORELHA SÃ DE CÃES NATURALMENTE E EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIA (LEISHMANIA) CHAGASI”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da comissão, Prof. Wagner Luiz Tafuri, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Renato de Lima Santos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Nelder de Figueiredo Gontijo	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2009.

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Orientador Wagner Luiz Tafuri

Prof. Renato de Lima Santos Renato de Lima Santos

Prof. Nelder de Figueiredo Gontijo Nelder de Figueiredo Gontijo

Prof. Wagner Luiz tafuri/Coordenador Wagner Luiz Tafuri

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Wagner Luiz Tafuri, Renato de Lima Santos e Nelder de Figueiredo Gontijo, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“ANÁLISE HISTOLÓGICA, PARASITOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DA PELE DE ORELHA SÁ DE CÃES NATURALMENTE E EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIA (LEISHMANIA) CHAGASI”**, apresentada pela mestranda **MARIA MARTA FIGUEIREDO** para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 19 de fevereiro de 2009.

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Orientador

Prof. Renato de Lima Santos

Prof. Nelder de Figueiredo Gontijo

Dedico não só essa,
mas todas as conquistas da minha vida,
ao Carlos Gualberto.
“in memorian”

Agradecimentos

Ao UNIVERSO, que sempre conspira a meu favor

Ao professor Wagner, por ter sido acima de tudo, meu educador

À professora Denise, por ter dado a mim a chance de estagiar no NIPE

À Luana, pelos primeiros ensinamentos no laboratório e por tudo o mais

À Izabela Amorim, pela gratuidade

À toda equipe do professor Wagner: Belinha, Eliane, Wanderson, Weverton, Felipe Arruda, Lucélia Pinheiro, Lucélia Coimbra, Vanessa, Rodrigo Castro, Tiago, Rodrigo Ludolf, Mariana, Sidney, Cassiana, Adolfo, Silvio Leite, Aldair e Leonardo

À toda a equipe do NIPE – alunos, professores e funcionários

À minha família, aos amigos e ao Leandro – pela ajuda e paciência

E a todos que me ajudaram de alguma forma.

Saibam que meu sentimento de gratidão é do tamanho do benefício que me dispensaram.

Muito obrigada!

*“Quanto mais você sua nos treinamentos,
menos sangra no campo de batalha.”*

Colonel Red

Colaboradores/ Financiadores

Esse trabalho contou com os seguintes colaboradores:

Prof. Dr. WASHINGTON LUIZ TAFURI do Laboratório de Neuro-Imuno-Patologia-Experimental (NIPE) do ICB-UFMG;

Prof^a. MARIA NORMA DE MELO do Laboratório de Biologia da *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG;

Prof^a. Dra. MARILENE SUZAN MARQUES MICHALICK do Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG;

Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

As leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública, sendo a forma visceral (LV) a mais grave. A LV é uma zoonose e o cão representa o principal reservatório doméstico do parasito. Embora 90% dos casos de leishmaniose visceral americana ocorram na região nordeste do Brasil, nos últimos anos, a prevalência e incidência dessa têm aumentado nos estados da região sudeste, dentre os quais Minas Gerais, onde a doença tem sido relatada em várias cidades incluindo Belo Horizonte.

Dessa forma, considerando o papel do cão na epidemiologia da LV, a busca por novos parâmetros diagnósticos, característicos dessa infecção nos cães, tem sido proposta.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o padrão e intensidade inflamatórios, relacionando-os ao parasitismo tecidual, na pele de orelha de cães infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Para isso, foi realizado um estudo em 133 cães, sendo 25 não infectados e 108 naturalmente infectados com *L. chagasi*, diagnosticados pela imuno-histoquímica em pele sã de orelha, sendo 55 procedentes da área metropolitana de Belo Horizonte – município de Santa Luzia-MG e 53 da área central. Em paralelo, a pele de dez cães da raça Beagle, experimentalmente infectados com formas promastigotas de *L. chagasi*, foi avaliada.

Após exame clínico dos cães naturalmente infectados, constatou-se maior frequência de animais sintomáticos (75,5%) em relação aos assintomáticos (24,5%), sendo esse quadro verificado especialmente nos cães da área metropolitana. A linfadenopatia e problemas dermatológicos constituíram os sinais clínicos mais presentes. Perfil inflamatório do tipo crônico foi observado na pele de 51 (92,7%) e 45 (84,9%) cães das áreas metropolitana e central, respectivamente, sendo que correlação positiva, porém fraca, foi observada entre a carga parasitária e a inflamação, uma vez que a presença de formas amastigotas de *Leishmania* e reação inflamatória não estavam necessariamente relacionadas. A carga parasitária dos cães avaliados diferiu em relação à área geográfica estudada, uma vez que os animais assintomáticos oriundos da área central apresentaram maior parasitismo tecidual. Considerando os animais

experimentalmente infectados, diferença estatisticamente inferior foi observada quanto à intensidade da inflamação e ao parasitismo tecidual quando comparados aos dos cães naturalmente infectados. Dessa forma, o padrão inflamatório não deve ser utilizado como característica patognomônica da infecção por *L. chagasi* e contrariamente à sua intensidade, não parece ser um parâmetro ideal para diferenciar modelos de infecção distintos.

Abstract

Although 90% of clinical cases of American visceral leishmaniasis (AVL) occur in the northeastern region of Brazil, the incidence of cases in recent years has increased in southeastern states such as Minas Gerais (MG), where the disease has been reported in several cities including Belo Horizonte, the state capital. Some studies have shown a strong correlation between the incidence of AVL and canine visceral leishmaniasis (CVL) in Belo Horizonte. A study of 108 dogs with parasite *Leishmania chagasi* detected by immunohistochemistry in healthy ear skin was obtained from 2 distinct geographical areas: 55 from a metropolitan area of the municipality (Santa Luzia, MG) and 53 dogs from a central area of Belo Horizonte. In parallel, a group of 10 beagles were experimentally infected with *L. chagasi*. Considering the clinical aspects of all naturally infected dogs, symptomatic dogs were more frequent than asymptomatic ones, especially, animals from the metropolitan area compared with the central area (79.6% and 20.3%, respectively). A chronic exudate was observed in the ear of 51 out of 55 dogs naturally infected from the metropolitan area (92.7%) and 45 out of 53 dogs naturally infected from the central area (84.9%). However there is a weak positive correlation between the parasite load and the chronic inflammatory reaction because we found cases where the presence of *Leishmania* was not directly incriminated in the presence of an inflammatory reaction. Importantly, asymptomatic dogs from the central area harbor more parasites in the skin than the asymptomatic ones from metropolitan area. In addition, a profound difference was noted in the intensity of the inflammatory reaction and parasite load in the skin of experimental infected dogs.

Lista de Gráficos

GRÁFICO 1	Frequência de dermatite crônica em todos os cães nos diferentes quadros clínicos: Grupo Controle (n=25); Grupo Experimentalmente infectado (n=10); Grupo Naturalmente Infectado da Área Central (n=53) e Grupo Naturalmente Infectado da Área Metropolitana (n=55)	44
GRÁFICO 2	Número de células inflamatórias na derme de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> nos diferentes grupos analisados: Cães Controle (n=25); Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10)	49
GRÁFICO 3	Número de células inflamatórias, na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). *diferença estatística entre cães experimentalmente e naturalmente infectados, p=0.0144	50
GRÁFICO 3A	Número de células inflamatórias, na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> assintomáticos e sintomáticos: Área Metropolitana (n=55) *diferença estatística, p<0,0004	50
GRÁFICO 3B	Número de células inflamatórias, na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> assintomáticos e sintomáticos: Área Central (n=53), p=0,4464	51
GRÁFICO 3C	Número de células inflamatórias, na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> assintomáticos e sintomáticos: Animais Experimentalmente infectados (n=10), p=0,3833	51
GRÁFICO 4	Número de amastigotas na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). *diferença estatística entre os grupos, p<0.0001	54
GRÁFICO 5	Número de amastigotas na derme de cães assintomáticos infectados com <i>L. chagasi</i> nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). *diferença estatística dos cães da Área central em relação aos outros grupos, p<0,001	55
GRÁFICO 6	Número de amastigotas na derme de cães sintomáticos infectados com <i>L. chagasi</i> nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). *diferença estatística entre os três grupos p<0,001	55
GRÁFICO 7A	Número de amastigotas na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> assintomáticos e sintomáticos: Área Metropolitana (n=55), p<0,1395	55

GRÁFICO 7B	Número de amastigotas na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> assintomáticos e sintomáticos: Área Central (n=53), p<0,5698	56
GRÁFICO 7C	Número de amastigotas na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> assintomáticos e sintomáticos: Cães Experimentalmente infectados (n=10), p<0,5167	56
GRÁFICO 8	Correlação entre a reação inflamatória e o parasitismo na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> : Área Metropolitana (n=55), R ² = 0,2491	58
GRÁFICO 9	Correlação entre a reação inflamatória e o parasitismo na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> : Área Central (n=53), R ² = 0,1124	58
GRÁFICO 10	Correlação entre a reação inflamatória e o parasitismo na pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i> : Animais Experimentalmente infectados (n=10), R ² = 0,2783	58
GRÁFICO 11	Comparação do número de mastócitos da derme nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). *diferença estatística entre cães da área central e os demais, p<0,001	59
GRÁFICO 12	Comparação do número de mastócitos da derme de cães assintomáticos e sintomáticos: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentalmente infectados (n=10). *diferença estatística entre cães da área central e os demais p<0,05	60
GRÁFICO 13	Correlação entre o número de mastócitos e células inflamatórias: Animais Experimentalmente infectados (n=10), R ² = 0,634	60

Lista de Figuras

FIGURA 1	Micrografia da pele de orelha de cães controle – cães não infectados	45
FIGURA 2	Micrografia da pele de orelha de cães controle – não infectados: Mastócitos	46
FIGURA 3	Micrografia da pele de orelha de cães infectados com <i>L. chagasi</i>	48
FIGURA 4	Micrografias de pele de orelha de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i>	52
FIGURA 5	Micrografias de pele de orelha de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i>	57

Lista de Tabelas

TABELA 1	Características histopatológicas na pele de orelha de cães naturalmente e experimentalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	53
-----------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de Abreviaturas

ASL	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i>
BSA	Solução de albumina bovina
CCZ	Centro de Controle de Zoonose
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CR3	Receptor para o terceiro Fator do Complemento
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FcγR	Receptor para a porção Fc das Imunoglobulinas
<i>g</i>	Gravidade
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Monócitos e Granulócitos
Gp63	Glicoproteína 63
HE	Hematoxilina-Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-γ	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulinas
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucinas
Kg	Quilograma
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
mg	Miligrama
MHC I	Complexo de Histocompatibilidade Principal da Classe 1

MHC II	Complexo de Histocompatibilidade Principal da Classe 2
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
NIPE	Laboratório de Neuro-Imuno-Patologia-Experimental
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tampão salina fosfato)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SMM	Sistema Monocítico Mononuclear
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	World Health Organization
α MEM	Minimum essential medium
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro
%	Porcentagem

Sumário

1.0	Introdução	20
2.0	Revisão de Literatura	22
2.1	As Leishmanioses	22
2.2	Ciclo biológico do parasito	22
2.3	Manifestações clínicas da leishmaniose no homem	23
2.4	Leishmaniose Visceral Canina	25
2.5	Leishmaniose Visceral Canina Experimental	26
2.6	A pele – o sítio inicial da infecção	28
2.7	Diagnóstico da leishmaniose	34
3.0	Objetivos	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4.0	Material e Métodos	38
4.1	Animais	38
4.1.1	Grupo I - cães controle	38
4.1.2	Grupo II - cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi	38
4.1.3	Grupo III - cães experimentalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi	39
4.1.3.1	Manutenção dos parasitos	39
4.2	Classificação clínica dos cães infectados	40
4.3	Avaliação da histopatologia	41
4.4	Avaliação do parasitismo tecidual	41
4.4.1	Imuno-histoquímica	41
4.4.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	41
4.5	Análises	42
4.5.1	Microscopia óptica	42
4.5.2	Morfometria	42
4.6	Análise estatística	42
5.0	Resultados	44
5.1	Aspectos clínicos	44
5.2	Histopatologia	44
5.2.1	Grupo controle	45
5.2.2	Animais infectados	46
5.3	Comparação da carga parasitária com os diferentes aspectos clínicos	54
5.4	Correlação entre a carga parasitária e a reação inflamatória	56
5.5	Mastócitos	59
6.0	Discussão	61
7.0	Conclusão	73

8.0	<i>Referências Bibliográficas</i>	74
Anexos		88
Anexo A		88
Anexo B		101

1.0 Introdução

As leishmanioses constituem um grave problema de Saúde Pública, com prevalência global estimada de 12 milhões de casos e incidência anual de 1,5 a 2 milhões, sendo 1 a 1,5 milhão de leishmaniose cutânea (LC) e 500 mil de leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2006). Incontestavelmente, essas infecções apresentam distribuição geográfica cada vez mais abrangente, com presença de casos em áreas que anteriormente eram consideradas não-endêmicas (WHO, 2002). Isso decorre principalmente de fatores ecológicos e demográficos, sendo a migração de pessoas e cães provenientes de regiões endêmicas para centros urbanos, associado às precárias condições sanitárias, desnutrição da população e a grande capacidade de adaptação do vetor (COSTA et al., 2008). Tudo isso constitui fatores que contribuem para o incremento do número de casos da doença. De fato, a situação da cidade de Belo Horizonte ilustra claramente esse processo, o qual ocorre também em outros grandes centros metropolitanos brasileiros como Recife, Natal, Teresina, João Pessoa (QUEIROZ et al., 2008), Rio de Janeiro (MARZOCHI et al., 1985) e Vitória (COSTA et al., 2008).

Os cães, *Canis familiares*, constituem o principal elo no ciclo doméstico da LV (DEANE e DEANE, 1962; KEENAN et al., 1984; MARZOCHI et al., 1985) e são considerados a principal fonte de infecção para os vetores, devido à elevada presença de parasitos na pele (CHAGAS et al., 1938; DEANE, 1955). Esse fato aliado à crescente prevalência da doença canina no Brasil e ausência de um tratamento eficaz (DESJEUX, 2004), levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde do Brasil a preconizarem a eliminação de cães soropositivos para antígenos de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, como medida de controle da infecção. Entretanto, técnicas sorológicas como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), usualmente utilizadas para diagnosticar a doença no cão, podem apresentar sensibilidade e especificidade reduzidas. Isso, associado à elevada taxa de reposição de cães, permite a manutenção de animais infectados, sendo esse aspecto considerado um dos motivos do insucesso no controle da LV (TESH, 1995; BANETH et al., 2008).

Os cães com leishmaniose visceral (LVC) geralmente apresentam elevada quantidade de parasitos na pele, mesmo na ausência de sintomatologia clínica (DEANE, 1956), o que favorece a infecção do inseto vetor e conseqüentemente, a transmissão para o homem. Cabe ressaltar que, a infecção humana, em nosso meio, não possui impacto no ciclo biológico, uma vez que esse não constitui fonte de infecção nas Américas (TESH, 1995). A comprovação da presença de parasitos na pele é um dado clínico-epidemiológico extremamente importante. Esse órgão assume papel relevante na LVC, não somente pelas manifestações clínicas cutâneas presentes em cerca de 70% dos casos (DEANE e DEANE, 1955; DEANE, 1956; FERRER et al., 1988; PRATS e FERRER, 1995), mas também por ser a fonte de contaminação para os flebotomíneos. Os vetores, uma vez infectados, transmitem os parasitos para hospedeiros vertebrados, que por sua vez, migram para algumas vísceras estabelecendo assim a infecção (MARZOCHI et al., 1985).

O fato de o cão apresentar alto parasitismo na pele, principalmente na região da orelha e espelho nasal, (TRAVI et al., 2001; MOURA et al., 2008) justifica o conhecimento dos aspectos clínicos, parasitológicos e histopatológicos desse órgão, sendo de grande importância para o diagnóstico da LV e alvo de estudo quando do tratamento. Através dessas análises pode-se confirmar a presença ou não de formas amastigotas da *L. chagasi*, identificando o animal como reservatório de parasitos.

Nesse trabalho foram examinadas biopsias de pele de cães naturalmente infectados de duas áreas distintas e experimentalmente infectados com *L. chagasi* com o objetivo de responder as seguintes perguntas: (1) a carga parasitária na pele poderia estar associada à intensidade e a natureza do processo inflamatório? (2) a presença de inflamação na pele e um padrão inflamatório específico, poderia ser tomado como indicativo de infecção pelo protozoário *L. chagasi*? (3) há diferença nesses parâmetros entre cães naturalmente e experimentalmente infectados?

2.0 Revisão de Literatura

2.1 As leishmanioses

As leishmanioses são doenças parasitárias que apresentam ampla manifestação clínica, causadas por protozoários digenéticos do Gênero *Leishmania*, pertencentes à Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida, Classe Zoomastigophora, Filo Sarcomastigophora e Sub-Reino Protozoa. Esses protozoários são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada da fêmea vetora infectada, hospedeiro invertebrado, a qual pertence ao Gênero *Lutzomyia* em países do Novo Mundo e *Phlebotomus* em países do Velho Mundo, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, Ordem Diptera, Classe Insecta e Filo Arthropoda (GRIMALDI e TESH, 1993; LAINSON et al., 1982).

As leishmanioses são consideradas endêmicas em 88 países de ambos, Velho e Novo Mundo. São causadas por diferentes espécies de *Leishmania* e constituem-se predominantemente zoonoses no homem e animais silvestres, incluindo roedores, marsupiais, edentados e canídeos. A OMS estima que a prevalência da doença seja em torno de 12 milhões de casos em todo o mundo e que 350 milhões de pessoas apresentam o risco de adquirir umas das formas da doença. Por essa razão, as leishmanioses encontram-se entre as seis doenças infecciosas tropicais de grande importância na Saúde Pública (DESJEUX, 2004).

2.2 Ciclo biológico do parasito

O protozoário do gênero *Leishmania*, descrito em 1903 por ROSS, são parasitos unicelulares que infectam humanos e outros vertebrados. Esses parasitos são transferidos para seus hospedeiros vertebrados no momento em que fêmeas do inseto vetor infectadas, ao fazerem o repasto sanguíneo, inoculam formas promastigotas metacíclicas na pele, sendo essas fagocitadas pelos macrófagos em um processo mediado por receptores (CUNNINGHAM, 2002). No interior dessas células hospedeiras, nos fagolisossomas, as promastigotas perdem o flagelo tornando-se arredondadas e são chamadas amastigotas que passam a se multiplicar por divisão binária, dando início ao possível sucesso da infecção. O processo ininterrupto de divisão rompe, eventualmente, o macrófago

infectado liberando as amastigotas, que são capazes de infectar novas células. Em novo repasto sanguíneo as fêmeas ingerem macrófagos-monócitos contendo amastigotas e essas, em seu trato digestivo, multiplicam-se e diferenciam-se em formas flageladas denominadas promastigotas procíclicas e posteriormente, em metacíclicas, forma infectante, que expressam açúcares lipofosfoglicanos (LPG) (KEMP et al., 1997). A presença de grande quantidade de LPG e outros glicoconjugados, como a metaloproteinase (gp)-63, na superfície do parasito, protege-o da ação das enzimas hidrolíticas presentes no intestino do flebotômíneo (KILLICK-KENDRICK, 1990; ALEXANDER et al., 1999). As promastigotas desligam-se do epitélio intestinal e migram para a probóscide, de onde são transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado, fechando, dessa maneira, o ciclo. Um flebotômíneo infectado é capaz de inocular de uma a 1000 formas promastigotas metacíclicas em cada repasto (ADLER e THEODOR, 1935; WARBURG e SCHLEIN, 1986).

2.3 Manifestações clínicas das leishmanioses no homem

As formas clínicas das leishmanioses manifestadas pelo homem dependem, principalmente, de seu perfil genético, da resposta imunológica montada frente ao parasito, da virulência e da espécie de *Leishmania* (GRIMALDI e TESH, 1993).

As leishmanioses podem ser divididas em duas categorias clínicas amplas: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A LT compreende três manifestações clínicas: as formas cutânea (LC), cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LMC) (ASHFORD, 2000). A LC é caracterizada por lesões localizadas, geralmente únicas, que, normalmente, podem apresentar cura espontânea, sem a necessidade de tratamento (GRIMALDI e TESH, 1993; DESJEUX, 2004). Pode ser causada pelas espécies *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major*, Velho Mundo; *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) panamensis*, Novo Mundo (ASHFORD, 2000). A LCD está associada a um quadro anérgico, sendo as lesões disseminadas, mas não ulcerativas (GRIMALDI e TESH, 1993). Pode ser causada pelas espécies *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) venezuelensis*, no Novo Mundo (WEIGLEE e SARAIVA, 1996) e pela *L. (L.)*

aethiopica, no Velho Mundo (DOWLATI, 1996). A LMC apresenta um quadro hiperérgico com lesões ulcerativas e destrutivas da mucosa, principalmente, da cavidade nasal. Os tecidos da cavidade oral, da faringe, dos lábios, da laringe e da traquéia podem também ser atingidos, provocando quadros de desnutrição e obstrução respiratória (GRIMALDI e TESH, 1993 e WEIGLE e SARAVIA, 1996). Pode ser causada pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* (DESJEUX, 2004).

A LV é causada pela *L. infantum*, Velho Mundo, e *L. chagasi*, Novo Mundo. É uma doença potencialmente fatal em humanos se não diagnosticada e tratada na sua fase inicial (WHO, 2006). Evidências existem que *L. infantum* e *L. chagasi* são variações de uma mesma espécie (MAURÍCIO et al., 2000). SHAW (2006) sugere a utilização da denominação *L. infantum chagasi* para designar essas espécies, entretanto nesse trabalho optamos pela denominação *L. chagasi*.

A LV é uma doença sistêmica caracterizada pelo envolvimento do baço, fígado, medula óssea e linfonodos (KEMP, 1997). Os sinais clínicos no homem são febre, diarreia, com períodos de remissão, surgindo sinais progressivos de anorexia, emagrecimento, fraqueza e desnutrição. Pode ocorrer aumento de volume abdominal com desconforto no hipocôndrio esquerdo devido a hepatoesplenomegalia. São comuns as manifestações gastrintestinais, fenômenos hemorrágicos e tosse seca. O paciente pode ser levado ao óbito por falta de um tratamento específico (BOGLIOLO, 1956; ANDRADE e ANDRADE, 1966).

As estimativas mundiais, em relação à LV, indicam que cerca de 200 milhões de pessoas encontram-se sob risco de adquirir a infecção e que 500 mil pessoas se infectam a cada ano. No ano de 2000 foram estimadas, na população mundial, 41 mil mortes causadas pela doença. Aproximadamente 90% dos casos mundiais de LV humana (LVH) estão notificados em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (GUERIN et al., 2002). No Brasil, a incidência de LVH aumentou de 1.977 casos em 1998 para 3.624 em 1999 chegando a 4.858 casos em 2000. Entretanto, após esse período, observou-se uma diminuição na incidência de LVH no país, com 3.203 em 2005. A LV tem incidência nas Regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-oeste, tendo crescido nessas regiões, com exceção do Nordeste, no período de 1990 a 2005, o que sugere que a doença encontra-se em

franca expansão (Brasil- Ministério da Saúde, 2006). Em Belo Horizonte, o número de casos de LV vem crescendo a cada ano (MARGONARI et al., 2006). Em 2006 foram relatados 113 casos de LVH com dez óbitos e 8.000 casos de LVC (Secretaria Municipal de Saúde – Belo Horizonte, 2006), já em 2008 foram relatados 125 casos com 17 óbitos de LVH e 11.955 com 10.285 eutanasiados de LVC (Secretaria Municipal de Saúde – Belo Horizonte, 2009).

2.4 Leishmaniose visceral canina

Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos do parasito (DEANE, 1956), tanto em locais onde o agente etiológico é a *L. infantum*, quanto em países onde é causada pela *L. chagasi* (CARDOSO et al., 1998). Nas Américas, somado a esse caráter de reservatório, os cães constituem companhia constante dos seres humanos, contribuindo para a disseminação da doença durante as migrações humanas (ARIAS et al., 1996).

A LVC apresenta-se clinicamente nas formas aguda, subaguda e crônica. Nos estudos com infecção experimental de cães têm-se observado um período de incubação bastante variável, oscilando de três meses a vários anos. Observa-se variado espectro de lesões e alterações patológicas, derivado das complexas interações da relação parasito com seu hospedeiro, devido à cepa e à espécie de *Leishmania* envolvidas e à variação na resposta imune individual do hospedeiro (GENARO, 1993).

As alterações dermatológicas nos cães são bastante comuns e variáveis quanto à caracterização e extensão. É frequente o quadro de hiperkeratose, caracterizado pelo espessamento excessivo da epiderme com descamação, despigmentação e formação de ulcerações. A descamação pode estar presente ao redor dos olhos, nas orelhas ou difusamente pelo corpo. Os pêlos podem apresentar-se opacos, frágeis e quebradiços, sendo comum o surgimento de áreas de alopecia. Alguns animais podem desenvolver um quadro de dermatite seborréica e também úlceras mucocutâneas. Onicogribose e onicorrexia são também observados com frequência. Na fase final da infecção ocorrem, em geral, paraparesia, inanição conduzindo a caquexia e óbito do animal (SLAPPENDEL e GREENE, 1990; GENARO, 1993; ALVAR et al., 2004). Segundo FERRER et al. (1988), a alopecia, lesão dermatológica mais frequente, dermatose ulcerativa,

doença nodular e dermatite pustular são quadros dermatológicos visualizados em cães acometidos pela LV.

As lesões histológicas são principalmente associadas à hipertrofia e hiperplasia do infiltrado linfoplasmoistocitário. São descritas lesões acometendo órgãos como fígado, baço, linfonodos, pulmões, medula óssea, intestinos, tegumento e vasos. Os sinais clínicos e o tempo de aparecimento da doença são variáveis oscilando entre ausência total de sinais até síndrome clínica grave (TAFURI et al., 1996, 2001; LIMA et al., 2004). Em geral, as lesões cutâneas consistem em uma dermatite crônica difusa na derme superficial e focal ao redor dos vasos e anexos. O infiltrado inflamatório é predominantemente de mononucleares, macrófagos, plasmócitos e linfócitos, associado a um variado grau de parasitismo. DEANE (1956) relataram a presença de amastigotas na pele de 77,6% dos cães naturalmente infectados no Ceará, enquanto GENARO (1993) verificou incidência de parasitismo na pele em 70% dos animais experimentalmente infectados com *L. chagasi*.

2.5 Leishmaniose visceral canina experimental

Poucas informações sobre a imunologia da LVC experimental estão acessíveis na literatura, em contraste à abundância de dados referentes à LVH e à infecção experimental murina. Um dos principais problemas na imprevisível natureza da resposta, onde um mesmo processo de inoculação induz diferentes padrões clínicos da doença, é que somos desprovidos de modelos de homogeneidade e reprodutibilidade necessários para obter conclusões definitivas (SOLBACH e LASKAY, 2000). Os fatores que afetam o sucesso e progressão da infecção experimental parecem ser a via de inoculação, concentração do inoculo e estágio do parasito. Segundo MORENO e ALVAR (2002) a inoculação intradérmica de parasitos, naturalmente ou experimentalmente, parecem induzir uma resposta específica na pele, com a seleção de clones de linfócitos T específicos na drenagem de linfonodos e o desenvolvimento de uma imunidade mediada por células para manter o controle do parasito por um longo tempo. Nesse caso o cão será então assintomático. Ao contrário, se o cão não é capaz de montar uma resposta imune eficiente e/ou o parasito escapa desse controle, ele se multiplicará e irá se disseminar, invadindo outros órgãos, levando à

imunossupressão e o aparecimento das formas clínicas da doença. Esse último estágio poderia ser induzido diretamente por inoculação endovenosa de parasitos permitindo assim uma disseminação rápida para órgãos como o baço e o fígado, onde eles se multiplicam. Nessa via o processo natural está acelerado e é suficiente para induzir doença sintomática.

CHAMIZO et al. (2005) observaram em cães da raça Beagle assintomáticos, experimentalmente infectados, uma maior expressão de citocinas do subtipo Th1. Entretanto, LAGE et al. (2007) observaram um balanço entre resposta Th1 e Th2. Apesar de ocorrer elevação da expressão de interleucina (IL)-10 e essa ser diretamente proporcional ao aumento dos sintomas clínicos e do parasitismo tecidual, houve também aumento da expressão de interferon gama (IFN- γ), também diretamente relacionado com o grau do parasitismo. Por outro lado, estudos sobre a resposta humoral canina mostram que há um aumento dos níveis de anticorpos da subclasse IgG2 específicos ao parasita em cães assintomáticos ou resistentes à infecção. Já o aumento do subtipo IgG1 pode estar relacionado com o desenvolvimento da doença (DEPLAZES et al., 1995). Todavia, segundo LEANDRO et al. (2001), altos níveis da subclasse IgG2 foram observados em cães sintomáticos. Esses autores observaram, em seus grupos experimentais, que o inoculo de promastigotas não induziu sinais clínicos da doença o que poderia estar relacionado com a ausência da saliva do vetor. A utilização de formas amastigotas mostrou-se mais efetiva na infecção, com significativa elevação dos níveis de anticorpos, quando comparados aos dos cães infectados com formas promastigotas (SANTOS-GOMES et al., 2000).

Baseado em estudos experimentais, GENARO (1993) verificou que cães, quando inoculados com *L. chagasi*, podiam apresentar quatro formas de evolução da infecção: 1 - Evolução frustra – animais que não apresentaram nenhuma alteração visível, entretanto pôde-se detectar parasitos em algum momento após o inoculo, desaparecendo em seguida; 2 - Evolução regressiva espontânea – animais que apresentaram, durante a fase inicial da doença, parasitismo transitório na medula óssea, coincidente com um período de emagrecimento, seguido de retomada do ganho de peso, sem apresentar nenhum outro tipo de alteração; 3 - Evolução aguda – animais que apresentaram parasitismo na medula óssea e cutâneo, emagrecimento acentuado durante todo o curso da infecção, associado com alopecia generalizada, descamação e lesões crostosas intensas

distribuídas por todo o corpo, onicogribose acentuada, envolvimento ocular e nasal e finalmente evolução para caquexia e sobrevida curta; 4 - Evolução crônica – animais que apresentaram parasitismo na medula óssea e cutâneo, emagrecimento leve ou moderado durante todo o curso da infecção, associado com alopecia localizada, lesões crostosas no pavilhão auditivo e em áreas de articulação, onicogribose, apatia, adenopatia, edema de patas, também de forma leve ou moderada e sobrevida longa. Concluindo que, o quadro clínico patológico decorrente da infecção experimental é imprevisível, refletindo, dessa forma, em uma diversidade de respostas clínica e imunológica observadas na natureza.

2.6 A pele – o sítio inicial da infecção

O flebotomíneo ao inserir a probóscide no hospedeiro vertebrado, promove a formação de um “pool” hemorrágico no local e devido à pequena extensão da probóscide, apenas os vasos superficiais da derme e da interface derme-epiderme são atingidos (De-ALMEIDA et al., 2003). Sem a atividade vasodilatadora da saliva, o inseto dificilmente poderia alcançar os capilares dérmicos. No hospedeiro vertebrado, a defesa natural será ativada devido à presença, no sítio de inoculação, dos mecanismos de defesa: sistema do complemento, trombinas, cininas, plaquetas, anticorpos naturais, fagócitos, dentre outros. Por outro lado, na saliva do vetor encontram-se elementos farmacologicamente ativos como: inibidores do complemento, maxadilán, adenosina, IL-2, apirase, prostaglandinas. Nesse cenário, será determinado o curso da relação parasito-hospedeiro (RIBEIRO, 1987).

A capacidade do hospedeiro vertebrado de desencadear uma resposta imediata frente à agressão através de vasoconstrição, coagulação e sistema fagocítico-neutrofítico, poderia diminuir a competência vetorial, impedindo e prevenindo a habilidade infectiva do inseto (GILLESPIE et al., 2000). Na pequena hemorragia formada, no sítio da picada do inseto, ocorre a quimiotaxia de células inflamatórias como neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, monócitos, macrófagos dentre outras (De-ALMEIDA et al., 2003).

Neutrófilos são células de vida curta, presentes em grande número no hospedeiro vertebrado, que provavelmente desempenham papel mais relevante na eliminação do parasito do que como célula hospedeira (CHANG, 1981). Eles

secretam IL-12, fator de crescimento tumoral (TGF)- β e podem apresentar antígenos via complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe II na presença de fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos (GM-CSF). É possível, que neutrófilos infectados em apoptose possam ainda constituir uma importante fonte de antígenos de *Leishmania* para células dendríticas (DE-ALMEIDA, 2002).

Células dendríticas da pele, potentes apresentadoras de antígenos, têm um papel decisivo como ponte entre resposta imune inata e adaptativa por ativar célula do tipo T ou linfócitos T “virgem”. Elas podem capturar neutrófilos apoptóticos infectados, fragmentos de *Leishmania*, incluindo material genético e em menor quantidade o parasito. Então, após essas etapas, adquirem o fenótipo de células maduras por apresentarem MHC de classe I e II, aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD54, CD80, CD86), liberação de IL-12 e capacidade de transportar o parasito da pele infectada para os linfonodos para apresentação ao linfócito T antígeno-específico (MOLL, 2000).

Além de neutrófilos e células dendríticas, outras células como os mastócitos, basófilos e eosinófilos podem estar presentes no sítio de inoculação, na fase inicial da infecção por *Leishmania*, no tecido ou na corrente sanguínea. Mastócitos maduros são encontrados em todos os órgãos e tecidos, mas tendem a se concentrar em regiões anatômicas expostas ao meio ambiente externo, como a pele e as mucosas dos aparelhos digestivo e respiratório, estando particularmente próximos aos vasos sanguíneos e linfáticos e aos nervos periféricos (OLIVEIRA et al., 2001). Segundo GALLI et al. (2005), os mastócitos podem estar envolvidos na apresentação de antígenos para os linfócitos T, dentre outras funções, entretanto, os mecanismos pelos quais eles podem influenciar o papel dos linfócitos T ainda não foram esclarecidos. Experimentos *in vitro* (BIDRI et al., 1997) demonstraram que mastócitos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c são diretamente infectados por promastigotas metacíclicas de *L. major* e *L. infantum* e liberam mediadores pré-formados β -hexosaminidase e fator de necrose tumoral (TNF)- α . Esses estudos sugeriram que os mastócitos poderiam participar na primeira linha de defesa, isto é, na imunidade inata, durante infecção cutânea local por parasitos de *Leishmania*. Mastócitos são capazes de produzir histamina e citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, as quais estão envolvidas na maturação de células dendríticas. Suas funções ainda não foram

definitivamente demonstradas e os produtos derivados de seus grânulos, tais como, histamina e proteoglicanos, os quais não estão presentes nos macrófagos, necessitam de estudos mais aprofundados (MAZZONI et al., 2001).

Os fagócitos mononucleares, monócitos e macrófagos, constituem importantes componentes da imunidade mediada por células. Dentre suas funções podemos citar a produção de enzimas proteolíticas e de outras substâncias que exibem efeitos microbicidas, a produção de mediadores solúveis, citocinas, que possuem efeito imunorregulador e o processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos T do tipo CD4⁺, associados ao MHC de classe II (CUNNINGHAM, 2002).

Uma vez internalizado pelo macrófago, o parasito pode multiplicar-se livremente dentro da célula, eventualmente alterando o microambiente ao seu favor (MOORE e MATLASHEWSKI, 1994). Mas para isso, o parasito necessita se ligar à célula do hospedeiro, uma vez que sua resistência ao sistema de complemento é dependente do tempo. Formas metacíclicas são mais resistentes à lise pelo complemento. Esse tempo crítico na vida da *Leishmania* tem sido estimado em menos que 2,5 minutos, não sendo surpresa que o parasito utilize múltiplos receptores celulares para garantir sua adesão e fagocitose pelos macrófagos (DOMINGUEZ et al., 2002).

A *Leishmania* é capaz de ativar o complemento, entretanto esse não consegue lisar o parasito devido à presença de moléculas de LPG e gp-63 na superfície das promastigotas metacíclicas. Essa resistência à lise se deve, em parte, a modificações estruturais da LPG que impedem a inserção do complexo de ataque à membrana (C5b-9). A gp-63 também previne a lise mediada por complemento e aumenta a adesão do parasito ao receptor CR3 por clivar C3b em C3bi (MOSSER et al., 1987; DESCOTEAUX e TURCO, 1999; ALEXANDER et al., 1999). As opsoninas do hospedeiro desempenham papel relevante na fagocitose, sendo que o complemento sérico tem demonstrado grande importância na adesão do parasito aos macrófagos (MOSSER et al., 1985). Oponização de promastigotas com o terceiro componente do complemento (C3b) facilita sua adesão ao macrófago via receptor do complemento. Macrófagos humanos apresentam duas classes de receptores para complemento, CR1 e Mac-1 (CR3) os quais se ligam preferencialmente a C3b e iC3b, respectivamente. A adesão de parasitos ao CR1 é transitória, mas ao Mac-1, receptor para iC3b, é responsável

por uma adesão mais firme, o que garante a fagocitose e melhora sua sobrevivência intracelular (DOMINGUEZ e TORANO, 1999).

A *Leishmania* é capaz de modular algumas funções dos macrófagos, tais como alteração na transcrição de sinais, diminuição da transcrição de genes para citocinas com alteração da produção das pro-inflamatórias e interferência no processo de fosforilação de proteínas celulares (KANE e MOSSER, 2000). Já dentro dos fagolisossomos, o parasito é capaz de inibir a explosão respiratória, um processo natural que ocorre após a fagocitose quando os lisossomos secundários se fundem ao vacúolo parasitóforo. Adicionalmente, a *Leishmania* inibe a atividade hidrolítica e de enzimas lisossomais, possivelmente através da inibição de cálcio e proteína-quinase C (TURCO e DESCOTEAUX, 1992).

A defesa inata do hospedeiro, que a maioria dos patógenos protozoários teciduais e sanguíneos precisam evadir, modificar ou evitar, varia de acordo com o modo de entrada e de permanência do parasito no tecido. Essa defesa inata inclui a barreira epitelial, o sistema do complemento e outros componentes líticos séricos, hidrolases lisossomais, reativos intermediários do oxigênio, funções imunorregulatórias e apresentação de antígenos pelas células dendríticas, as quais provêm uma ligação crucial com a resposta imune adaptativa, uma vez que essas células apresentadoras de antígenos interagem com os linfócitos (SACKS e SHER, 2002; De-ALMEIDA et al., 2003).

Na LV a resposta imune protetora é mediada pela imunidade do tipo celular. A resistência à infecção está associada à capacidade dos linfócitos T CD4⁺ produzirem IFN- γ , levando ao estabelecimento da resposta do subtipo Th1, a qual protege contra patógenos intracelulares. Por outro lado, a progressão da doença está relacionada com a resposta do subtipo Th2 caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (REINER e LOCKSLEY, 1995).

A LV ocorre preferencialmente em áreas tropicais e subtropicais do globo, onde existe uma exposição intensa da pele ao sol. A irradiação ultravioleta (UV) tem efeitos intensos na imunologia da pele, incluindo redução na densidade e na habilidade de células de Langerhans na epiderme, incremento da secreção de IL-10 e prostaglandinas E2 pelos ceratinóticos, com elevação do nível sérico de IL-4, indução de IL-12p40 pelas células dendríticas e macrófagos (SHREEDHAR et al., 1998). Assim a irradiação parece induzir um resultado imunossupressor com redução da ativação celular do subtipo Th1 e elevação da ativação celular do

subtipo Th2. Esse poderia ser um microambiente ideal para a infecção pela *Leishmania*. Inexplicavelmente, é sabido que uma baixa dose de irradiação UV eleva os níveis séricos de IFN- γ na pele, conferindo proteção contra LC em modelo murino (KHASKHELY et al., 2002).

Alterações teciduais na LVC são provavelmente desencadeadas pelo tipo de resposta imune do hospedeiro. A literatura atual considera que cães assintomáticos apresentam uma resposta imune mediada por células Th1 com elevada produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ . Por outro lado, cães sintomáticos apresentam uma resposta imune do tipo humoral com incremento da produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e proliferação linfocitária antígeno-específica deprimida, como verificado em estudos *in vitro* por PINELLI et al. (1994) e BARBIERI (2006).

Os animais assintomáticos são assim classificados por não demonstrarem nenhum sinal clínico da doença ou por desenvolverem somente nódulos cutâneos que geralmente localizam-se nas regiões da orelha e espelho nasal. Nesses animais a resposta resistente se caracteriza por uma dermatite com presença de células de Langerhans e ceratinócitos expressando MHC de classe II, linfócitos T, macrófagos e parasitos na derme (FERRER, 1999).

Existem estudos que afirmam que o aumento do número de linfócitos do tipo TCD8⁺ tem importante papel na resistência à infecção por *Leishmania* (HILL et al., 1989; MULLER et al., 1991; ABRANCHES et al., 1998; SOLANO-GALLEGO et al., 2001 e 2004). Essas células têm sido implicadas no controle da LV por participarem da resposta imune adquirida específica desenvolvida pelo hospedeiro (GOMES-PEREIRA et al., 2004). Segundo KIMA et al. (1997), há processamento e apresentação de peptídeos da *Leishmania*, via MHC de classe I, em macrófagos infectados para os linfócitos T do tipo CD8⁺.

Cães com sintomatologia clínica manifestam diversos sinais da doença e apresentam uma resposta do subtipo Th2, com exagerada produção de anticorpos. Nesses animais, as células mononucleares do sangue periférico são incapazes de produzir IFN- γ na presença do antígeno (PINELLI et al., 1994). BOURDOISEAU et al. (1997) relataram a ocorrência de imunossupressão associada com número reduzido de linfócitos T do tipo CD4⁺ e linfócitos B do tipo CD21⁺.

Outra citocina implicada na infecção é o TGF- β , que conduz a progressão ou previne a cura da leishmaniose em modelos murinos (HIRSCH et al., 1997). Segundo GANTT et al. (2001), promastigotas vivas e sobrenadantes de culturas de promastigotas são capazes de ativar TGF- β latente e esse, uma vez ativado, pode prolongar a sobrevivência de parasitos em culturas de macrófagos.

O recrutamento celular para o sítio da infecção é essencial para efetiva resposta imune celular no hospedeiro. O processo é controlado por quimiocinas, citocinas quimiotáticas, produzidas por leucócitos e células teciduais. Na LV, algumas quimiocinas e receptores para quimiocinas têm um papel relevante no desenvolvimento da resposta do tipo Th1, pois sua deleção influencia na produção de IFN- γ por linfócitos T. Quimiocinas parecem estar envolvidas também na amplificação de linfócitos T na resposta inflamatória, um passo importante na defesa do hospedeiro com LV. Camundongos infectados com *L. donovani* sofrem uma acumulação hepática rápida de quimiocinas como MIP-1 α , CCL2 e CXCL10 após a infecção (COTTERELL et al., 1999). Entretanto, apenas a expressão de CXCL10, amplificada por células T, permanece elevada durante a última fase sendo essencial para a formação de granulomas no fígado e resposta inflamatória (ROUSSEAU et al., 2001).

Na leishmaniose ocorre diminuição da resposta imune celular específica devido, em parte, à queda do número de linfócitos T do tipo CD4⁺, responsável pela patogênese e progressão da doença. Cães naturalmente infectados com LV ativa apresentaram percentual de linfócitos T do tipo CD4⁺ significativamente menor em relação ao dos cães não infectados (BOURDOISEAU et al., 1997). MORENO et al. (1999), observaram correlação positiva entre os níveis de linfócitos T do tipo CD4⁺ e a resposta linfoproliferativa a antígenos leishmaniais solúveis, em estudos realizados *in vitro*. Segundo REIS (2001), cães naturalmente infectados sintomáticos apresentaram diminuição nas subpopulações de linfócitos T do tipo CD4⁺ e CD8⁺, sugerindo deficiência de resposta celular antígeno-específica.

Entretanto, a dicotomia Th1 e Th2, a qual induz a resistência e susceptibilidade, respectivamente, não é absoluta. Estudos realizados em camundongos, susceptíveis à *Leishmania*, depletados do gene que codifica IL-4 indicam que esses podem apresentar infecção progressiva quando infectados por *L. major* (NOBEN-TRAUTH et al., 1996). Essa citocina, quando presente nas

fases iniciais da resposta imune, pode estimular células dendríticas a produzirem IL-12, induzindo maturação das células Th1 e resistência do camundongo susceptível à *L. major* (BIEDERMANN et al., 2001). Além disso, estudos sugeriram que TNF- α e IFN- γ não são fatores decisivos no fenótipo resistente/susceptível quando da infecção por *Leishmania* (MORRIS et al., 1993). Deve-se ainda ressaltar que a produção simultânea de citocinas do perfil Th1 e Th2 em camundongos infectados demonstra a importância dessa imunorregulação para o controle da doença. Fica claro então que a defesa contra a LV está relacionada com a habilidade do hospedeiro em montar uma resposta imune mediada por células capaz de controlar e/ou eliminar o parasito (LOHOFF et al., 1998).

2.7 Diagnóstico das leishmanioses

O diagnóstico da LVC apresenta-se dificultado por vários fatores, principalmente devido à variabilidade das manifestações clínicas, à ausência de lesões características da doença, à inespecificidade da histopatologia e à inexistência de testes de fácil acesso à população, que apresentem alta especificidade e sensibilidade (ROURA et al., 1999).

Os métodos sorológicos utilizados no diagnóstico da LV visam a detecção de anticorpos específicos contra o parasito. Em geral, as técnicas mais utilizadas constituem a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a análise de imunoadsorção por ligação enzimática (ELISA), o teste de aglutinação direta e o *western blot*, pois apresentam sensibilidade e especificidade que alcançam entre 80 e 100%. Cabe ressaltar que cães com LV, em estágio inicial da doença, podem apresentar-se soronegativos da mesma forma que, mesmo após a cura clínica de animais com LVC, os testes sorológicos podem permanecer reativos por longo período de tempo, variando de meses a anos. Dessa forma, a utilização de testes sorológicos no diagnóstico da LVC deve ser tomado com cautela (FERRER et al., 1995).

Os testes parasitológicos constituem o método de diagnóstico de eleição, pois confirmam a positividade da LV. Nesses, a detecção do parasito é feita utilizando-se biopsias ou aspirados de tecidos relevantes. O teste parasitológico

mais simples e mais utilizado pelos veterinários é a identificação microscópica de formas amastigotas, a partir da confecção, em lâminas, de esfregaços de aspirados da medula óssea ou de linfonodos, coradas com Giemsa (DEANE et al, 1955). Esse teste é rápido, de baixo custo e apresenta elevada especificidade, entretanto, exibe reduzida sensibilidade, pois estudos demonstram ser a sensibilidade inferior a 60% em aspirados de medula óssea e inferior que 30% nos linfonodos (FERRER, 1999).

Análises histológicas da pele e linfonodos também são testes frequentemente utilizados para o diagnóstico da LVC, entretanto, deve-se procurar dissociar as alterações histopatológicas, como inflamação ou granuloma, de um diagnóstico positivo da doença (TAFURI et al., 1996 e 2001). Esse deverá ser confirmado pela presença de formas amastigotas do parasito. Entretanto, na maioria dos casos poucas formas amastigotas estão presentes, o que dificulta essa avaliação. Nessas situações, a análise histológica deve ser associada à imuno-histoquímica, que apresenta elevada sensibilidade e detecta o parasito em cortes de tecidos, através do uso de anticorpos específicos (FERRER et al., 1988; BOURDOISEAU et al., 1997 e TAFURI et al., 2004).

Outra forma de diagnóstico corresponde ao isolamento do parasito através de cultura, *in vitro*, ou pela inoculação de aspirados em animais de laboratório, como hamster (PALMA e GUTIERREZ, 1991; SUNDAR e RAI, 2002).

Com o avanço da tecnologia biomédica, técnicas moleculares vêm sendo também empregadas no diagnóstico da LV. A detecção do DNA do parasito, pela técnica da Reação em cadeia da polimerase (PCR) é realizada através da coleta de amostras de vários tipos, como aspirados de medula óssea, sangue e linfonodos. Essa técnica, apesar do custo elevado, apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo rotineiramente utilizada em pacientes humanos (REITHINGER et al., 2002). Estudo feito em cães naturalmente infectados por *Leishmania* mostrou maior sensibilidade da técnica de PCR, quando comparada a imuno-histoquímica e H&E, utilizando pele de orelha, portanto essa tem se mostrado como uma importante ferramenta no diagnóstico dessa doença (XAVIER et al., 2006).

A densidade de parasitos na pele e a quantidade de células inflamatórias parasitadas constituem importantes estratégias da *Leishmania* para perpetuar sua espécie, uma vez que essas características potencializam a infectividade de

fêmeas vetoras, quando do repasto sanguíneo. A partir desses conhecimentos, elaboramos os objetivos e procedimentos para responder se a carga parasitária na pele poderia estar associada com a intensidade e a natureza do processo inflamatório em cães naturalmente e experimentalmente infectados.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar histológica e parasitologicamente a pele de cães de duas áreas distintas de Belo Horizonte, naturalmente e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar parâmetros clínicos dos cães naturalmente e experimentalmente infectados;
- 2- Analisar a histologia da pele dos animais de forma qualitativa empregando a microscopia óptica;
- 3- Quantificar as células inflamatórias e as formas amastigotas de *Leishmania*, na pele dos cães infectados, empregando a microscopia óptica e morfometria e comparar esses dois métodos de quantificação;
- 4- Quantificar os mastócitos, na pele dos cães infectados, pela morfometria.

4.0 Material e Métodos

4.1 – Animais

Nesse trabalho foram utilizados cento e quarenta e três cães divididos em três grupos experimentais descritos a seguir:

4.1.1 Grupo I - cães controle

O primeiro grupo é composto por 25 cães adultos, sem idade e raça definidas, não infectados com *Leishmania chagasi*, os quais foram sorologicamente, pelo teste de imunofluorescência indireta (RIFI) - Anexo A - e ensaio imunoenzimático (ELISA) – Anexo A - e parasitologicamente, pelo teste de imuno-histoquímica – Anexo A, negativos para *Leishmania*. Esses animais foram subdivididos em dois grupos: (1) 20 cães oriundos da área metropolitana de Belo Horizonte, Santa Luzia, obtidos do Centro de Zoonoses e (2) cinco da raça Pastor Alemão mantidos no canil do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sendo esses provenientes de Barbacena, área não endêmica. Esse grupo recebeu água e alimento *ad libitum* e foi constantemente avaliado por veterinários. Durante esse experimento, todos os procedimentos invasivos foram feitos de acordo com procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) segundo o protocolo 190/2006, Anexo B.

4.1.2 Grupo II - cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*

Esse grupo é composto por 108 cães sem idade e raça definidas, adultos, naturalmente infectados com *L. chagasi*. Entretanto, provieram de dois ambientes distintos: (1) 55 da área metropolitana de Belo Horizonte, Santa Luzia, obtidos do Centro de Zoonose e mantidos no canil do ICB até a necropsia e (2) 53 da área central de Belo Horizonte, obtidos da clínica veterinária Santo Agostinho. Quanto aos cães provenientes da clínica, o material recebido para análise foi biopsia de pele de orelha já fixada em formol. A prática de recebimento das biopsias de pele de animais suspeitos de infecção por *Leishmania* faz parte de um projeto de

extensão realizado no Departamento de Patologia Geral, protocolo UFMG/FUNDEP 5830-Sub28. A clínica veterinária escolhida foi contactada, estando ciente desse trabalho ofereceu apoio para obtenção de dados desses animais.

Como critério de inclusão dos cães naturalmente infectados para *L. chagasi*, todos deveriam ser positivos pelos exames sorológicos de RIFI, ELISA e imuno-histoquímica.

O método de imuno-histoquímica segundo TAFURI et al. (2004), foi usado para a detecção de formas amastigotas em biopsias de pele de orelha.

4.1.3 Grupo III - cães experimentalmente infectados com *Leishmania chagasi*

Esse grupo é composto por dez cães da raça Beagle, com idades variando entre três a nove meses. Esses foram inoculados com 1ml, por via intravenosa, com 5×10^7 promastigotas/ml ressuspensa em solução tampão fosfato (PBS). A infecção foi confirmada por RIFI, ELISA, imuno-histoquímica e Reação em cadeia da polimerase (PCR) de biopsias de pele de orelha. A confirmação parasitológica foi evidente 90 dias pós-infecção.

Os cães foram mantidos no laboratório farmacêutico veterinário Hertape-Calier® Saúde Animal em canis estruturados com medidas de biossegurança. O canil apresentava tela de aço inoxidável com “mesh” específico que não permite a passagem de flebotomíneos e, ao mesmo tempo, permite a entrada de luz. Além disso, a tela foi borrifada com piretróide trimestralmente. Também foram instaladas armadilhas do tipo Center Disease of Control (CDC) para captura de flebotomíneos a fim de detectar a densidade desses insetos. A limpeza foi realizada no canil diariamente, com aplicação de hipoclorito de sódio a 1% e utilização de vassoura de fogo.

4.1.3.1 Manutenção dos parasitos

Para a infecção experimental utilizou-se a cepa (MCAN/BR/2000/BH400) de *L. chagasi*, cedida pelo Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia (ICB). Essa cepa foi mantida em hamsters e

cultivada *in vitro* em meio alpha-minimum essencial médium (α -MEM) (Gibco[®] BRL) com 10% de soro bovino fetal (Sigma[®]) suplementado com 200U de penicilina/ml (Sigma[®]), 100 μ g de estreptomicina/ml (Sigma[®]) com pH 7,4 e mantidos a 23°C em incubadora FANEM[®] (modelo 347). As promastigotas *Leishmania* em fase estacionária foram lavadas uma vez em PBS, centrifugadas a 200g por 10 minutos/18°C e ressuspensas a 5×10^7 parasitos/ml em PBS.

4.2 Classificação clínica dos cães infectados

Os cães da área metropolitana do grupo II e os experimentalmente infectados foram classificados em assintomáticos, animais clinicamente saudáveis e em sintomáticos, animais exibindo pelo menos um dos sinais clássicos da doença tais como: alterações cutâneas - alopecia, dermatite esfoliativa, úlcera, onicogribose; ceratoconjuntivite; perda de peso; hepatoesplenomegalia; linfadenopatia dentre outros (LIMA et al., 2004).

Logo após o exame clínico, os animais foram pesados e em seguida anestesiados com acepromazina 1% na dosagem de 0,1 ml/kg de peso vivo por via intravenosa (i.v.) e com Thiopental Sódico[®] na concentração de 2,3%, dose de 1 ml/kg/i.v., sendo posteriormente realizada a punção de medula óssea para confecção de esfregaços. A eutanásia foi então realizada mediante aplicação de T-61[®]/i.v., na dosagem de 0,3 ml/Kg (Laboratório Hoechst Roussel). Comprovado o óbito, iniciou-se o exame necroscópico para retirada de fragmentos de pele do terço superior da orelha seguindo metodologia de MOURA et al., 2008. Fragmentos de órgãos como fígado, baço, linfonodos, rins, pulmões e medula óssea costal foram colhidos e processados para análises histológicas, utilizados em trabalhos paralelos.

Quanto aos cães da clínica veterinária Santo Agostinho, as amostras de pele analisadas foram biopsias de orelha fixadas em solução de formol a 10%, sendo essas coletadas por meio de “punchs” de 5 mm de diâmetro. O local biopsiado foi anestesiado com lidocaína a 2%. A anamnese e a avaliação clínica foram fornecidas pelos veterinários da clínica.

4.3 Avaliação da histopatologia

Todos os fragmentos de pele de orelha foram retirados de área não lesionada.

Exceto os 53 cães vindos da clínica veterinária dos quais recebemos biopsias fixadas em formol a 10%, todos os outros animais, ou seja, os 25 do grupo controle, os 55 naturalmente infectados da área metropolitana e os dez experimentalmente infectados, foram submetidos ao protocolo de eutanásia, descrito no item 4.2. As amostras coletadas foram fixadas em solução de formol tamponado a 10%, pH 7,2, sendo posteriormente processadas em equipamento histotécnico automático seguindo-se desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo os fragmentos dos órgãos foram cortados em micrótomo na espessura de 4 µm e montados em lâminas previamente desengorduradas com álcool-éter e banhadas em solução gelatinosa de fixação – Anexo A. Em cada lâmina foram colocados dois cortes. Posteriormente, os cortes histológicos foram corados pelas técnicas rotineiras de Hematoxilina e Eosina (H&E), Anexo A, para análise das alterações histológicas e Dominici, Anexo A, para análise dos mastócitos. Para a coloração de mastócitos foi feito Giemsa lento, Giemsa rápido, Azul de toluidina e Dominici sendo que essa última foi feita seguindo o protocolo com pH controlado, Azul de toluidina com pH 1,5 e Azul de toluidina com pH 3,5, e Dominici sem pH controlado.

4.4 Avaliação do parasitismo tecidual

4.4.1 Imuno-histoquímica

A marcação de formas amastigotas de *Leishmania* foi realizada pela técnica da imuno-histoquímica (TAFURI et al., 2004), Anexo A.

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A extração do DNA das amostras dos fragmentos de pele incluídos em parafina foi realizada utilizando o “DNA ISOLATION KIT[®]” (Gentra, EUA) seguindo instruções do fabricante, Anexo A.

4.5 Análises

4.5.1 Microscopia óptica

Na avaliação microscópica foram observados a reação inflamatória e o parasitismo tecidual, sendo considerados sob os aspectos qualitativo e quantitativo. Na análise qualitativa, considerou-se a presença de úlceras, necrose, acantose, pérola córnea, hiperkeratose, parakeratose, degeneração, granuloma, célula gigante, plasmocitose, alterações dos folículos pilosos e distribuição dos parasitos. Na análise quantitativa fez-se a contagem das células inflamatórias e das formas amastigotas em 20 campos escolhidos de maneira aleatória.

4.5.2 Morfometria

Na avaliação morfométrica levou-se em consideração a reação inflamatória, o número de mastócitos e a carga parasitária tecidual. Para a avaliação quantitativa foram escolhidos aleatoriamente e fotografados 20 campos de cada lâmina, no microscópio óptico ZEISS, com microcâmera JVC-TK1270 acoplada e com função red green blue ativada em objetiva de 40x, como descrito por CALIARI (1997). Levou-se em consideração a média do número de células inflamatórias observadas nos 20 campos das lâminas coradas pela H&E, de mastócitos nas lâminas coradas por Dominici e de formas amastigotas nas lâminas marcadas pela imuno-histoquímica. A quantificação foi realizada no programa KS300 pertencente ao Laboratório de Processamento de Imagens, no Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG.

4.6 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas por meio dos programas estatísticos computacionais Prism 4.0 e GraphPad InStat, adotando um nível de significância de $p < 0,05$. Baseando-se na natureza da distribuição não paramétrica dos dados obtidos para a reação inflamatória e parasitismo utilizou-se o teste ANOVA e teste *t* de *Student* (não pareado). Para os dados que não passaram pelo teste de normalidade, foi feito o teste de Kruskal Wallis. Para análises de correlação o

teste aplicado foi o Coeficiente de Correlação de Spearman, quando os valores não passaram pelo teste de normalidade e de Pearson, quando os valores passaram pelo teste de normalidade.

5.0 Resultados

5.1 Aspectos clínicos

Descamações cutâneas e emagrecimento foram observados em quatro cães (16%) pertencentes ao grupo controle.

Em relação aos animais naturalmente infectados das áreas metropolitana e central, encontrou-se 86 cães sintomáticos (79,6%) e 22 assintomáticos (20,4%). Os principais achados clínicos foram lesões na pele, linfadenopatia, onicogrifose e emagrecimento. A dermatite esfoliativa e a alopecia foram encontradas principalmente na face ao redor dos olhos e espelho nasal.

Apenas três cães (30%) do grupo experimentalmente infectado desenvolveram sinais clínicos da doença. Linfadenomegalia cervical foi a alteração mais frequente e em apenas um desses observou-se descamação cutânea.

5.2 Histopatologia

Sobre o aspecto histológico, a dermatite crônica foi observada em todos os grupos (GRÁF. 1)

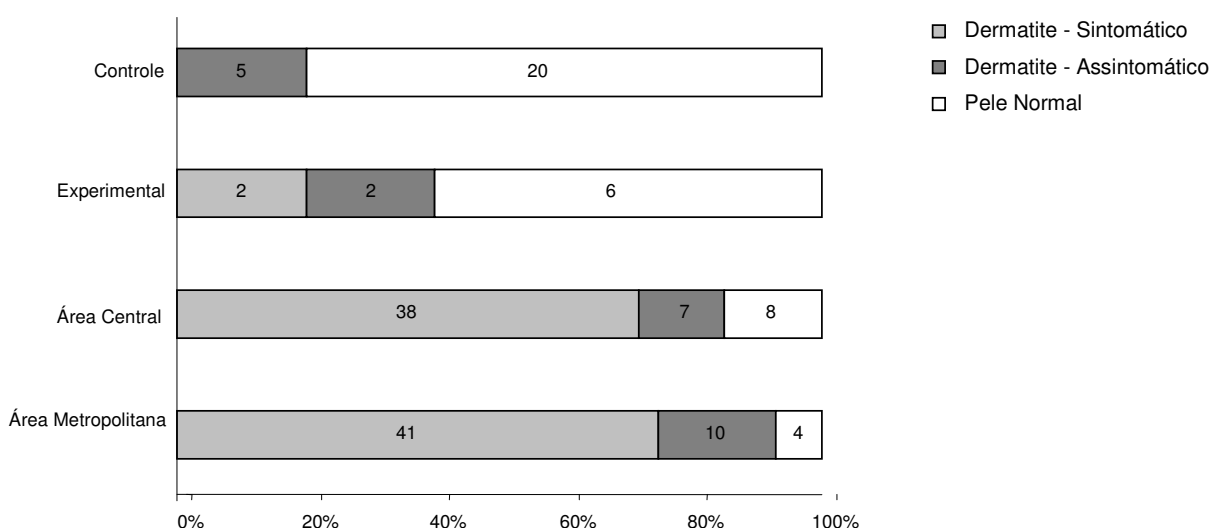


GRÁFICO 1- Frequência de dermatite crônica em todos os cães nos diferentes quadros clínicos: Grupo Controle (n=25); Grupo experimentalmente infectado (n=10); Grupo naturalmente infectado da Área Central (n=53) e Grupo naturalmente infectado da Área Metropolitana (n=55)

5.2.1 Grupo controle

O quadro de dermatite foi encontrado em cinco cães (20%) desse grupo. A avaliação histológica de todo o grupo revelou um quadro predominantemente normal, sendo que as poucas células intersticiais apresentaram aspecto morfológico de fibroblastos e macrófagos, estando essas situadas mais próximas à região reticular da derme (FIG. 1). Raros plasmócitos puderam ser encontrados. As fibras do interstício apresentaram-se regulares, paralelas à epiderme, porém descontínuas. Em 12 biopsias (48%) observou-se alteração degenerativa nas células epidérmicas e, em sua maioria, essa degeneração foi localizada nas células basais de forma extensa. As células epiteliais eram aumentadas de tamanho, hipocoradas, com citoplasma de aspecto vacuolado resultando em separação do núcleo do citoplasma indicando degeneração hidrópica. Essa degeneração foi também observada em células do epitélio dos folículos pilosos. Vale ressaltar que as lesões descritas nesse grupo foram encontradas nos animais obtidos da área metropolitana de Belo Horizonte. Naqueles obtidos da área não endêmica, Barbacena-MG, não se observou sequer uma alteração.

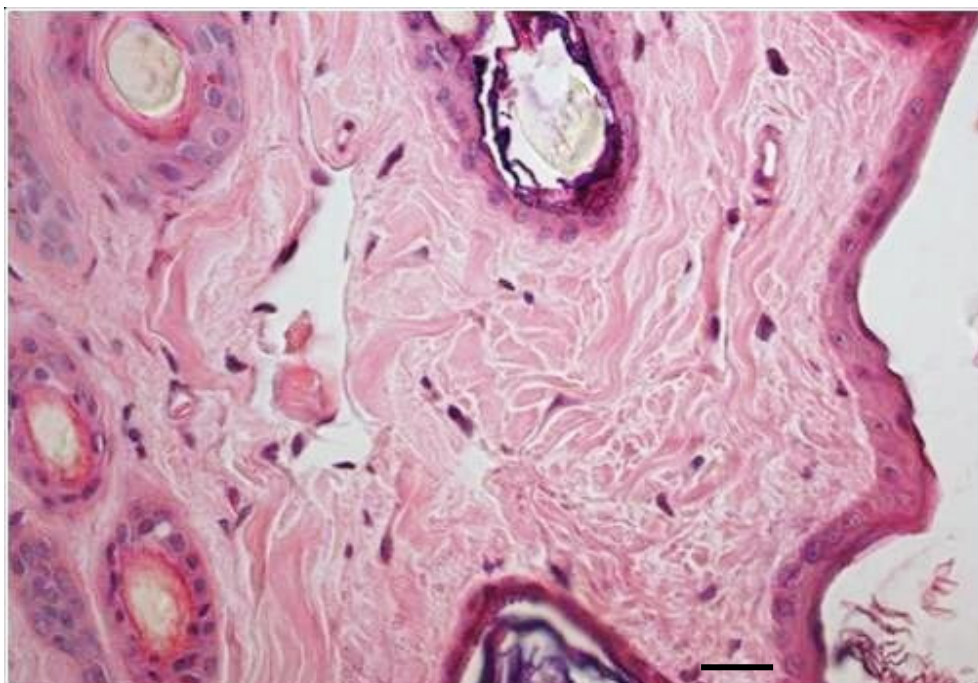


FIGURA 1- Micrografia da pele de orelha de cães controle – cães não infectados. Hematoxilina & Eosina. (Barra = 20µm)

A presença de mastócitos foi observada em todos os segmentos da pele, predominando ao redor de vasos sanguíneos. Seu número não apresentou correlação com a intensidade da inflamação (FIG. 2).

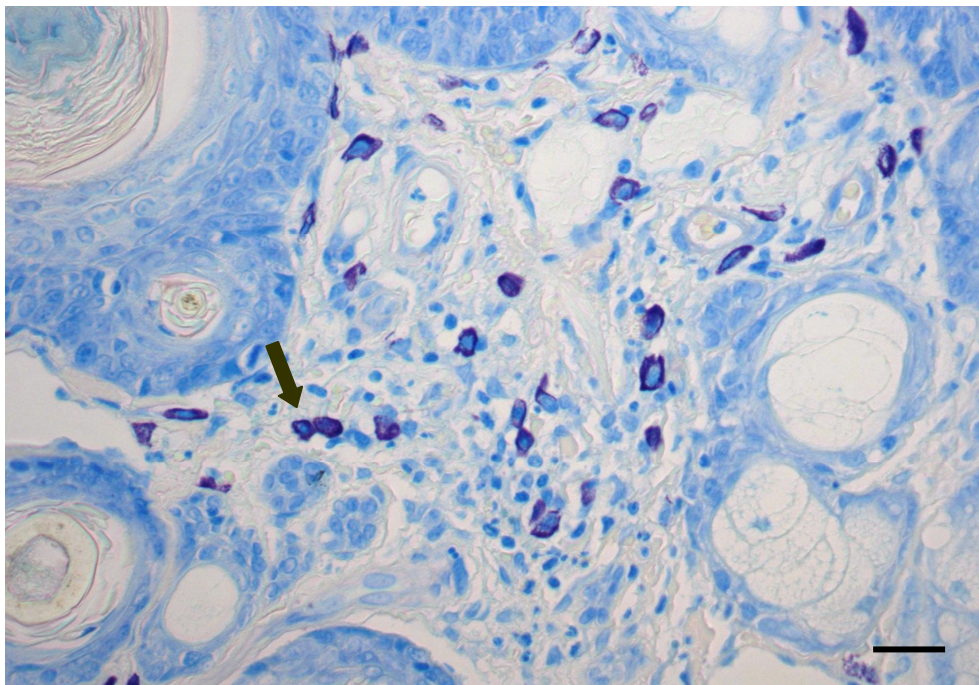


FIGURA 2- Micrografia da pele de orelha de cães controle – cães não infectados: Mastócitos (seta). Dominici. (Barra = 20µm)

5.2.2 Animais infectados

A dermatite crônica foi a lesão mais frequente nesse grupo observada em 51 cães (92,7%) naturalmente infectados da área metropolitana, sendo 41 sintomáticos e 10 assintomáticos e em 45 cães (84,9%) da área central, sendo 38 sintomáticos e sete assintomáticos. A reação inflamatória foi caracterizada por um infiltrado celular no interstício composto principalmente por macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Em geral, foi difuso na derme superficial e focal ao redor de vasos, glândulas e folículos pilosos na derme profunda (FIG. 3-A). Com frequência observou-se macrófagos epitelióides, com e sem parasitos, no infiltrado celular (FIG. 3 C-F), ao passo que, a formação de granuloma não foi encontrada em nenhum dos casos estudados. Células gigantes também foram observadas nesse cenário (FIG. 3-F). Plasmocitose foi observada em 62 animais (57,4%) naturalmente infectados (FIG. 3 F), sendo que, esse quadro histológico

foi visto mais frequentemente em cães da área metropolitana (73,6%) do que da área central (37,7%). Em cães experimentalmente infectados a plasmocitose foi menos intensa do que nos animais naturalmente infectados, mas teve frequência semelhante à dos grupos naturalmente infectados, (60%).

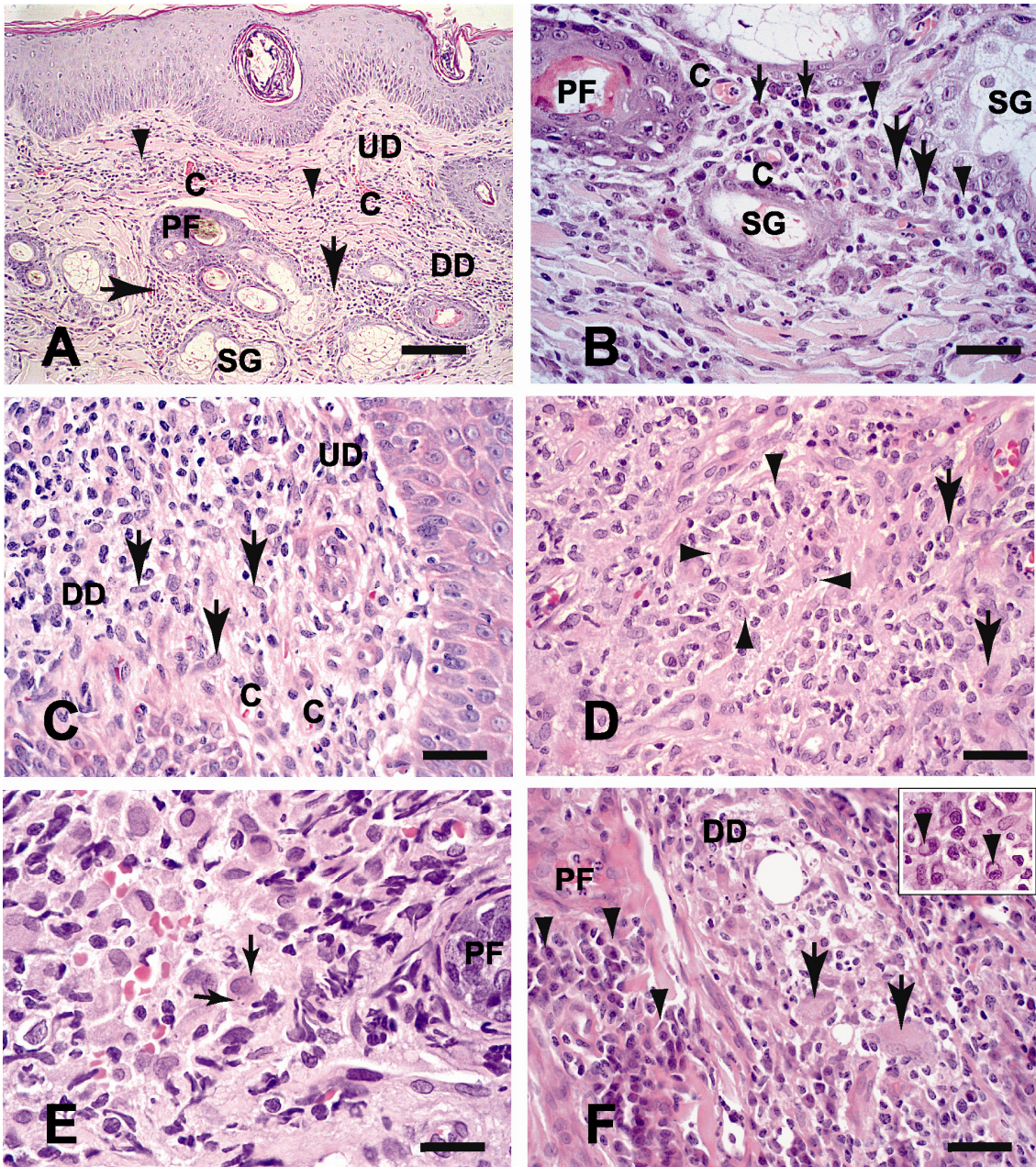


FIGURA 3- Micrografia da pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi*: (A) Reação inflamatória difusa na derme superficial (UD) (cabeças de setas) e focal na derme profunda (DD) (setas). Folículos pilosos (PF); Glândulas Sebáceas (SG); Capilares (C). Hematoxilina-Eosina (HE) (Barra = 60 μ m); (B) Infiltrado celular crônico macrófagico (setas largas); plasmócitos (setas finas); linfócitos (cabeças de setas) ao redor dos vasos, folículos e glândulas na derme profunda. Hematoxilina-Eosina (HE) (Barra = 20 μ m); (C) Macrófagos epitelióides (setas) em todas as camadas da derme. Hematoxilina-Eosina (HE) (Barra = 20 μ m); (D) Células epitelióides, agregados de macrófagos em um infiltrado celular crônico, onde a distribuição dessas células foi difusa (setas) ou eventualmente agregadas (cabeça de setas). Hematoxilina-Eosina (HE) (Barra = 20 μ m); (E) Em maior aumento (objetiva óleo de imersão) mostrando amastigotas dentro de macrófagos epitelióides (cabeças de setas) na derme profunda. Hematoxilina-Eosina. (Barra = 7 μ m); (F) Observe a plasmocitose (cabeças de setas) à esquerda e células gigantes (setas) Hematoxilina-Eosina. (Barra = 20 μ m). "Insert": no ângulo direito superior (objetiva óleo de imersão) plasmócitos com citoplasma vacuolado (cabeças de setas) indicando atividade do Complexo de Golgi. Hematoxilina-Eosina. (Barra = 7 μ m).

Em alguns casos observou-se degeneração hialina com aparente descontinuidade entre as fibras colágenas aparecendo, algumas vezes, com orientação vertical caracterizando edema dérmico. A degeneração hidrópica foi observada em mais de 70% dos cortes sendo encontrada tanto nas células basais, granulosas e espinhosas da epiderme, quanto nas células dos folículos pilosos, nem sempre relacionada com a intensidade da inflamação.

Considerando os cães que apresentaram o quadro de dermatite crônica, como citado no início dessa seção, verificou-se uma frequência mais elevada em cães sintomáticos (81) do que em assintomáticos (19). Qualitativamente, a reação inflamatória crônica variou de discreta a intensa, sendo que a última foi observada, mais frequentemente, nos cães da área central, seguidos pelos da área metropolitana e finalmente pelos animais experimentalmente infectados.

O estudo quantitativo da reação inflamatória foi feito através da contagem do número de células em 20 campos, na microscopia óptica e na morfometria, utilizando objetiva de 40. Entretanto, não houve diferença estatística entre as duas técnicas utilizadas. (GRÁF. 2).

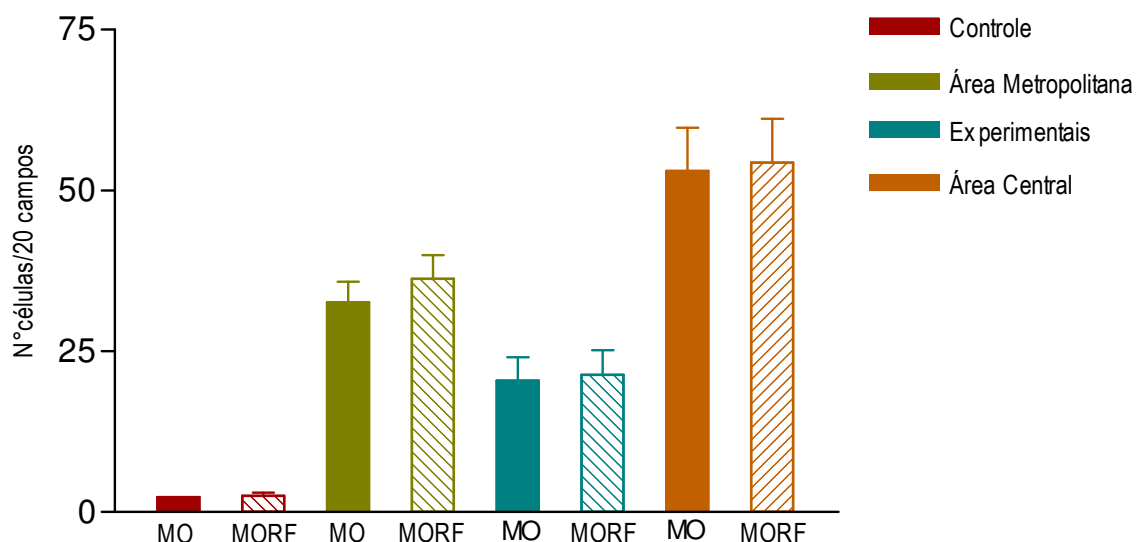


GRÁFICO 2- Número de células inflamatórias na derme de orelha de cães infectados com *L. chagasi* nos diferentes grupos analisados: Cães Controle (n=25); Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). MO = microscopia óptica. MORF = morfometria

Considerando os grupos de cães estudados, empregando a análise morfométrica, houve diferença estatística significativa quando da quantificação de

células inflamatórias entre os cães naturalmente e experimentalmente infectados (GRÁF. 3). A comparação da reação inflamatória entre os cães sintomáticos e assintomáticos, dentro de cada grupo, revelou que apenas no grupo de cães da área metropolitana houve diferença estatística significativa (GRÁF. 3A-C).

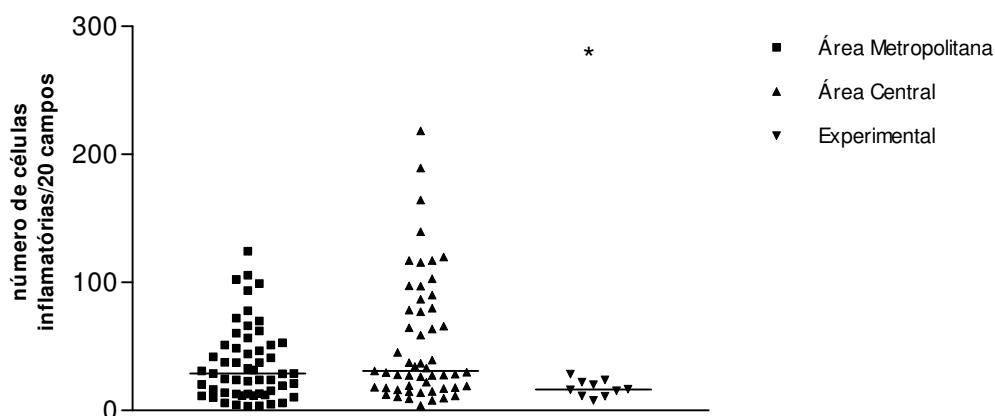


GRÁFICO 3- Número de células inflamatórias, na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi* nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). *diferença estatística entre cães experimentalmente e naturalmente infectados ($p=0.0144$)

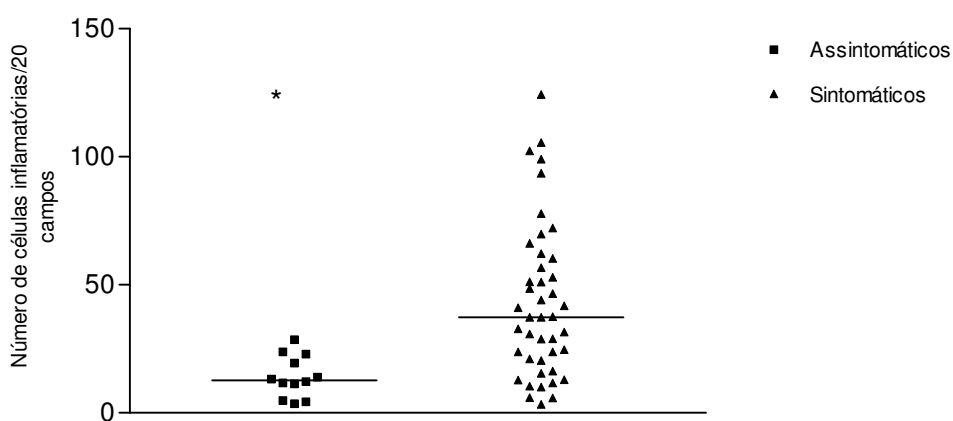


GRÁFICO 3A- Número de células inflamatórias, na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi* assintomáticos e sintomáticos: Área Metropolitana (n=55) *diferença estatística ($p<0,0004$)

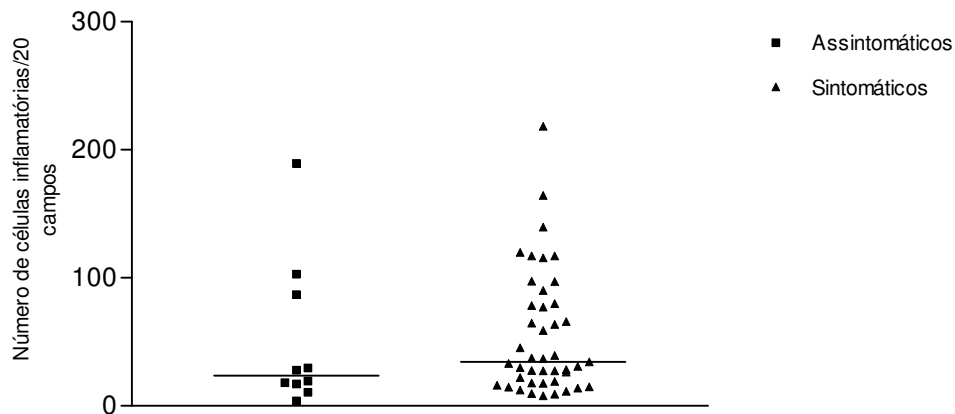


GRÁFICO 3B- Número de células inflamatórias, na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi* assintomáticos e sintomáticos: Área Central (n=53) ($p=0,4464$)

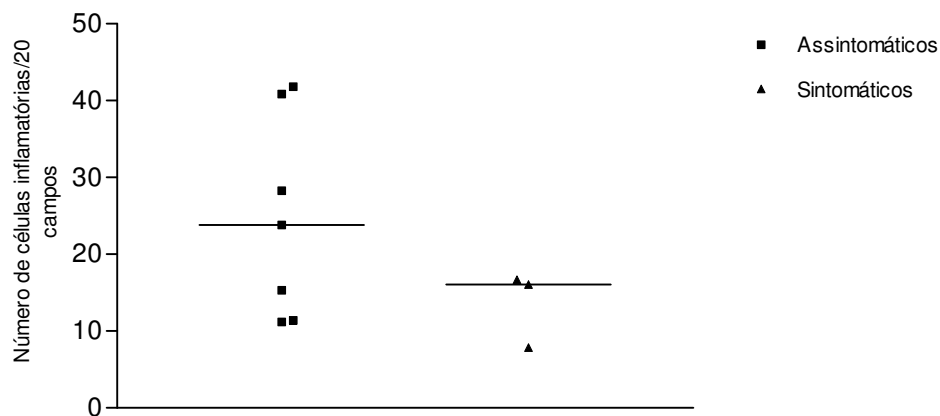


GRÁFICO 3C: Número de células inflamatórias, na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi* assintomáticos e sintomáticos: Animais experimentalmente infectados (n=10) ($p=0,3833$)

Alterações epidérmicas foram frequentemente encontradas, principalmente nos casos que apresentaram reação inflamatória intensa. Hiperkeratose, acantose, parakeratose, papilomatose, espongirose, vacuolização das células epidérmicas e degeneração epidérmica foram as alterações epiteliais mais frequentemente observadas (FIG. 4). Focos de parakeratose intensa foram associados com hiperkeratose em 20 casos (16,9%). Necrose intersticial ocorreu em apenas 11 cães (9,3%), considerando os três grupos (TAB. 1) e lesões ulcerativas foram encontradas em nove casos (FIG. 4, TAB. 1).

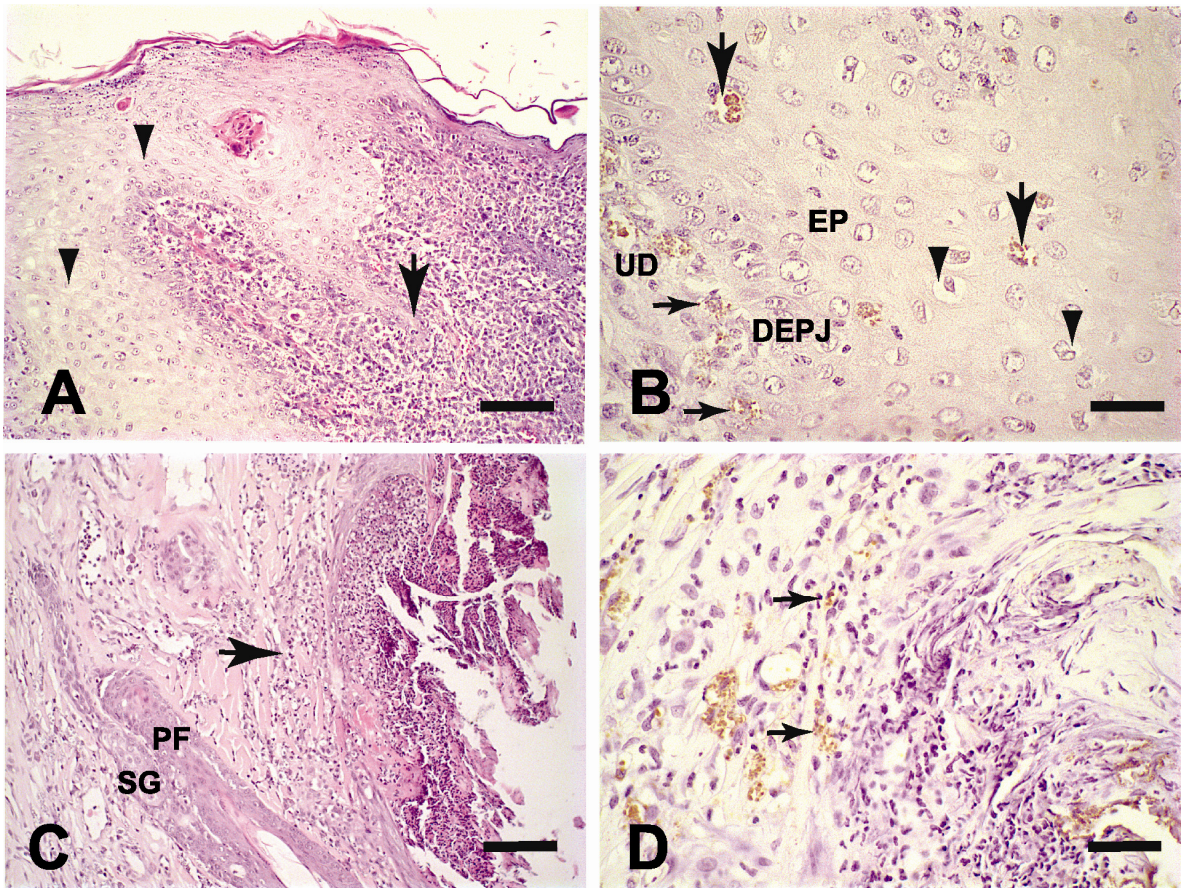


FIGURA 4- Micrografias de pele de orelha de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*: (A) Alterações epidérmicas como acantose (cabeça de seta) e papilomatose (seta). Hematoxilina-Eosina (Barra = 60µm); (B) Amastigotas imunomarcadas (setas) podem ser vistas nas células da epiderme. Degeneração hidrópica está demonstrada pela cabeça da seta. Note muitas amastigotas em macrófagos localizados na junção dermo-epidérmica (DEPJ) (setas finas). Epitélio (EP); Derme superficial (UD); Derme Profunda (DD); Estreptoavidina-peroxidase (Barra = 20µm); (C) Lesões ulcerativas e infiltrado crônico mononuclear na derme (setas). (PF) Folículo piloso; (SG) Glândula sebácea. Hematoxilina-Eosina (Barra = 60µm). (D) Amastigotas imunomarcadas (setas) Estreptoavidina-Peroxidase (Barra = 20µm).

Tabela 1

Características histopatológicas na pele de orelha de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *L. chagasi*

Características Histopatológicas	Área Metropolitana (n=55)		Área Central (n=53)		Experimentalmente infectado (N=10)	
	Assintomáticos	Sintomáticos	Assintomáticos	Sintomáticos	Assintomáticos	Sintomáticos
Dermatite	10	41	7	38	2	2
Parasitismo	12	43	10	43	6	2
Ulceração	0	7	0	2	0	0
Degeneração	5	31	3	30	3	2
Acantose	2	23	3	14	0	1
Hiperceratose	3	13	3	15	5	2
Paraceratose	4	10	0	5	1	0
Plasmocitose	9	33	4	16	4	2
Necrose	0	8	1	2	0	0

Tanto a necrose intersticial quanto a epidérmica estavam associadas a uma dermatite intensa focal apresentando predomínio de células mononucleares e muitas delas com núcleos picnóticos. Essas, por sua vez, eram sempre envolvidas por excesso de queratina e fibras colágenas hialinas.

Na tela subcutânea, a alteração mais comum foi observada em quadros de inflamação intensa, sendo que todo o panículo adiposo era invadido por infiltrado inflamatório crônico, não se observando a conexão entre esse tecido e a derme superficial.

Mastócitos foram encontrados nas diferentes camadas da derme e em grande número naqueles animais que apresentavam quadro histológico normal. A localização foi predominante ao redor de vasos sanguíneos. Nenhuma correlação numérica foi observada com a intensidade da inflamação.

Em relação ao grupo dos animais experimentalmente infectados, o quadro de dermatite crônica foi observado em quatro cães (40%), sendo dois cães sintomáticos e dois assintomáticos. Todavia, essa alteração histológica apresentou-se sempre mais discreta em relação aos animais naturalmente infectados (TAB. 1), sendo comumente focal. Apenas uma biopsia (10%) apresentou inflamação intensa. O acúmulo celular foi de macrófagos, plasmócitos

e linfócitos, estando esses, na maioria dos casos, localizados ao redor de vasos e folículos pilosos.

5.3 Comparação da carga parasitária com os diferentes aspectos clínicos

A análise morfométrica mostrou que a carga parasitária foi estatisticamente diferente entre os grupos avaliados, sendo mais elevada nos cães da região central. Os cães experimentalmente infectados tiveram carga parasitária reduzida quando comparada à dos naturalmente infectados (GRÁF. 4).

Considerando a carga parasitária, em relação ao estado clínico e a área geográfica, os cães assintomáticos da área central albergam mais parasitos do que os cães assintomáticos da área metropolitana. Os animais experimentalmente infectados assintomáticos também tiveram menor carga parasitária (GRÁF. 5). O mesmo resultado foi obtido ao comparar os animais sintomáticos (GRÁF. 6). A comparação da carga parasitária entre os cães sintomáticos e assintomáticos, dentro de cada grupo, revelou não haver diferença estatística entre eles (GRÁF. 7A-C).

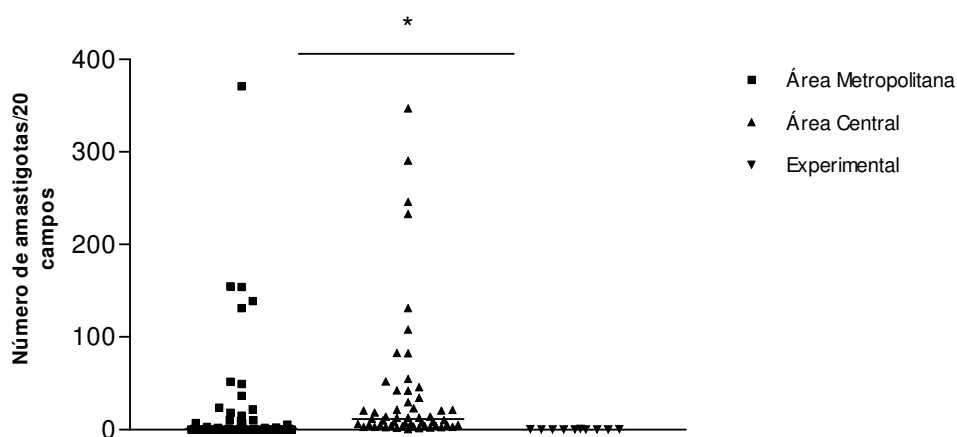


GRÁFICO 4- Número de amastigotas na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi* nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). *diferença estatística entre os grupos p<0.0001

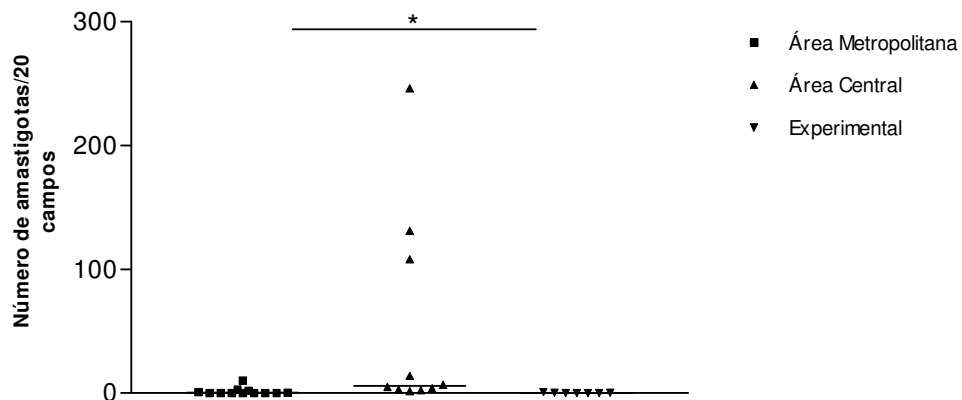


GRÁFICO 5- Número de amastigotas na derme de cães assintomáticos infectados com *L. chagasi* nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). *diferença estatística dos cães da área central em relação aos outros grupos $p < 0,001$

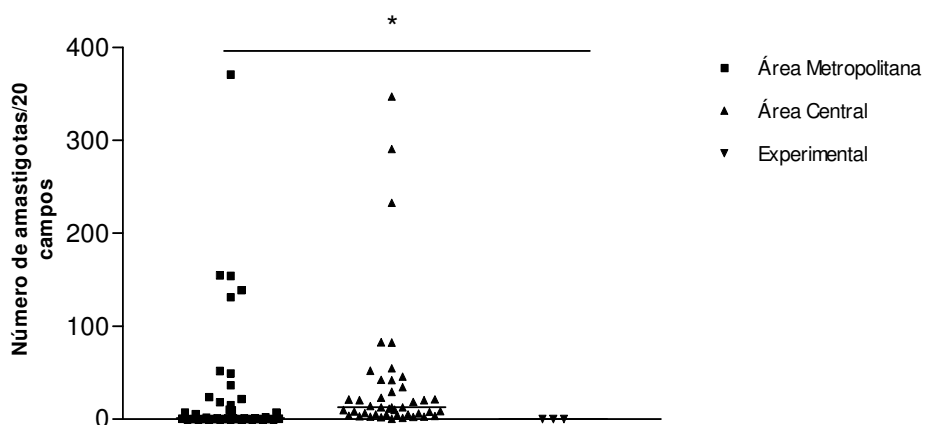


GRÁFICO 6- Número de amastigotas na derme de cães sintomáticos infectados com *L. chagasi* nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentais (n=10). *diferença estatística entre os três grupos $p < 0,001$

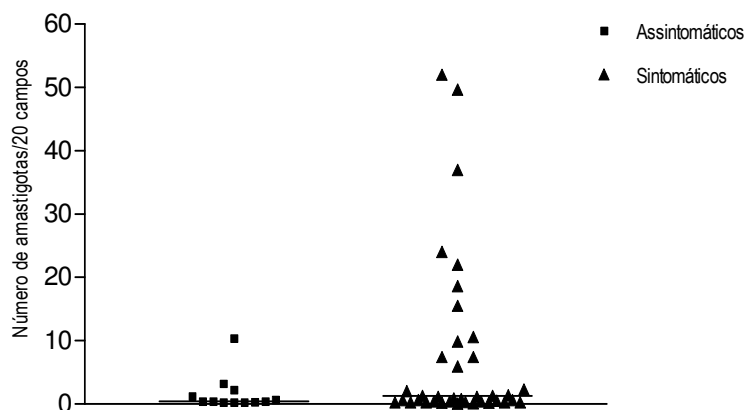


GRÁFICO 7A- Número de amastigotas na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi* assintomáticos e sintomáticos: Área Metropolitana (n=55), $p = 0,1395$

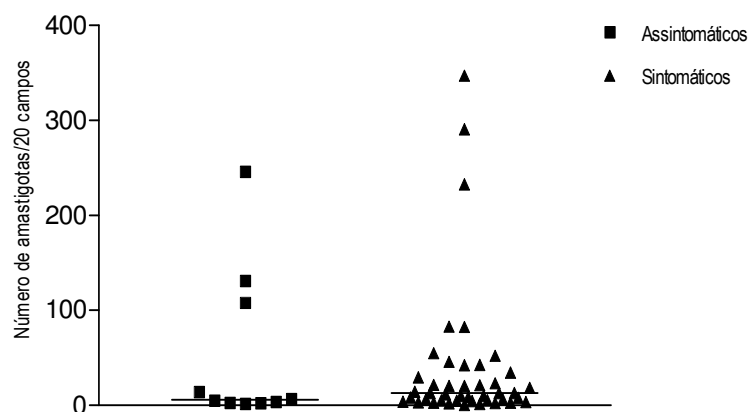


GRÁFICO 7B- Número de amastigotas na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi* assintomáticos e sintomáticos: Área Central (n=53), p=0,5698

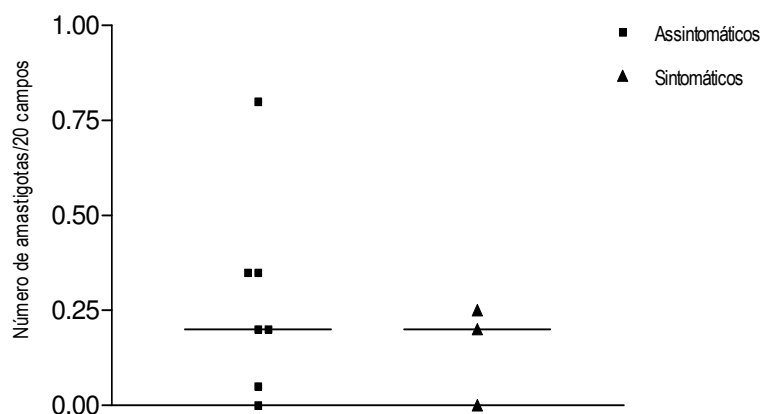


GRÁFICO 7C- Número de amastigotas na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi* assintomáticos e sintomáticos: Cães experimentalmente infectados (n=10) p=0,5167

5.4 Correlação entre a carga parasitária e a reação inflamatória

Em alguns casos, visualizamos parasitismo tecidual intenso na derme, mas sem correspondência com uma reação inflamatória intensa, ou seja, naquela em que o infiltrado celular é difuso acometendo todas as camadas da derme. Quadros de parasitismo intenso com a presença de poucas células inflamatórias também foram observados, como visualizado na figura 5. Apesar dessas situações, uma correlação direta entre a carga parasitária e a reação inflamatória foi encontrada (GRÁF. 8, 9,10).

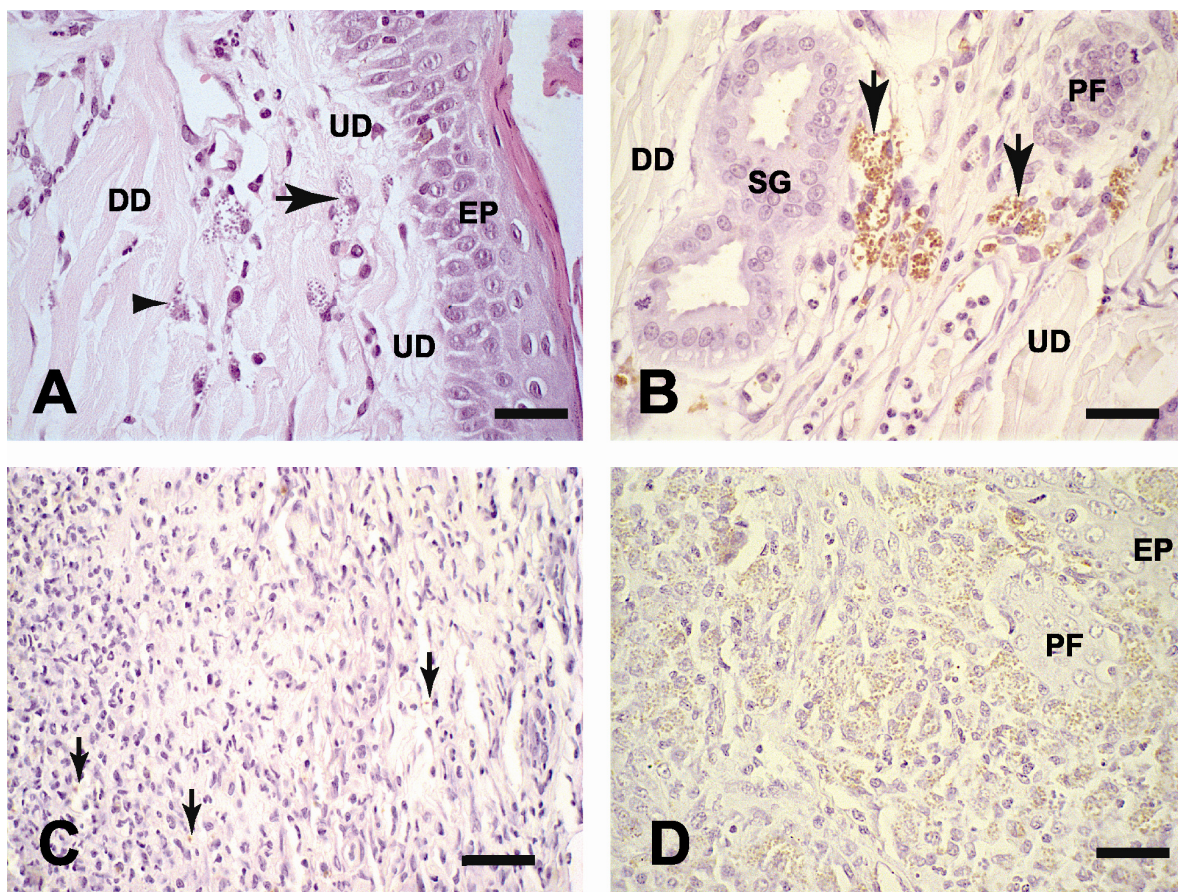


FIGURA 5- Micrografias de pele de orelha de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*: (A) Amastigotas podem ser observadas na derme superficial (setas) e na derme profunda (cabeça de setas). Hematoxilina-Eosina (Barra = 20 μ m); (B) Amastigotas imunomarcadas (setas) podem ser vistas na derme. Epitélio (EP); Derme Superficial (UD); Derme profunda (DD); Folículo Piloso (PF), Glândulas sebáceas (SG); Estreptoavidina-peroxidase (Barra = 20 μ m); (C) Um infiltrado crônico intenso com algumas amastigotas imunomarcadas detectadas por imuno-histoquímica (setas). Estreptoavidina-Peroxidase (Barra = 20 μ m). (D) Um infiltrado intenso com uma carga parasitária alta detectada pela imuno-histoquímica. Estreptoavidina-peroxidase (Barra = 20 μ m).

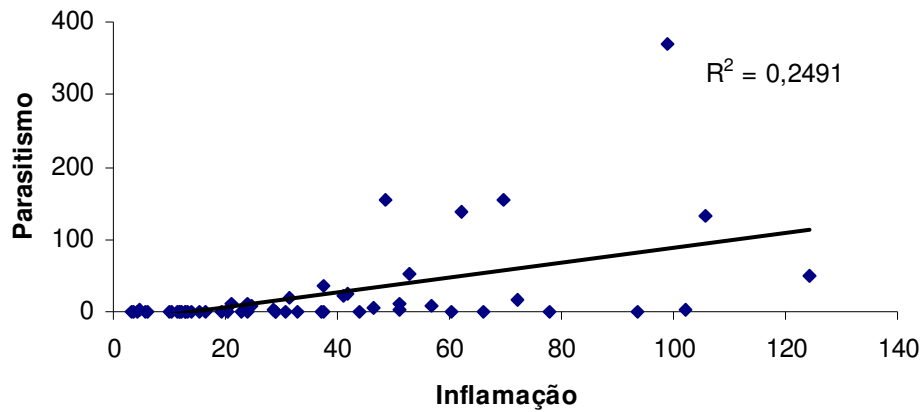


GRÁFICO 8- Correlação entre a reação inflamatória e carga parasitária na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi*: Área Metropolitana (n=55), $R^2 = 0,2491$

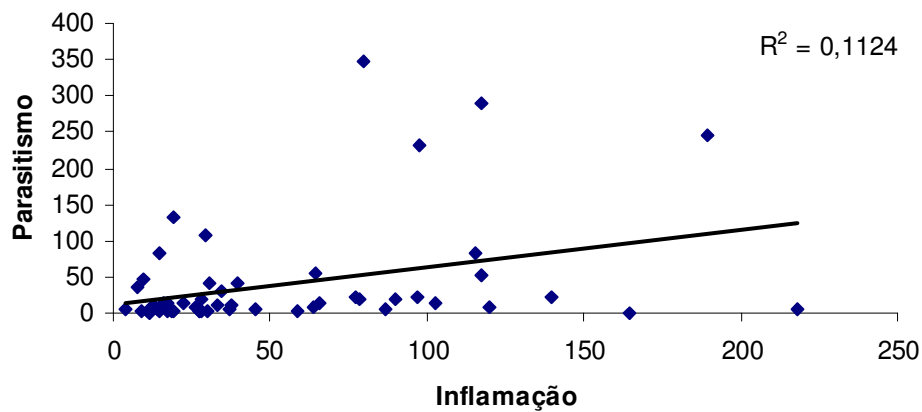


GRÁFICO 9- Correlação entre a reação inflamatória e a carga parasitária na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi*: Área Central (n=53), $R^2 = 0,1124$

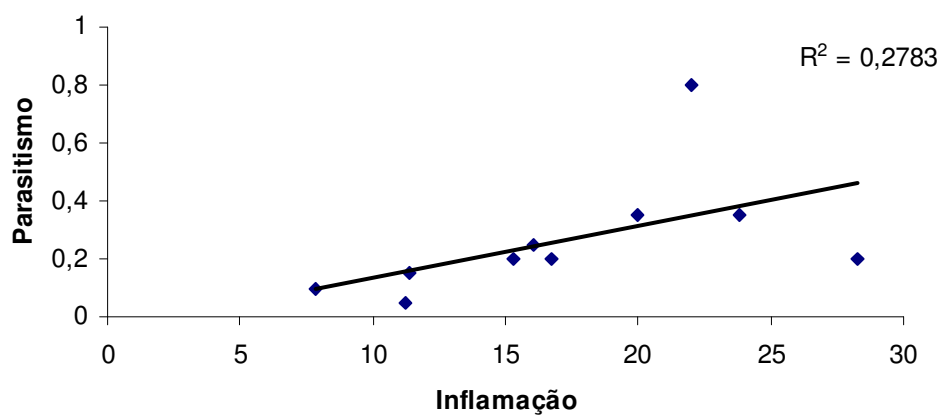


GRÁFICO 10- Correlação entre a reação inflamatória e a carga parasitária na pele de orelha de cães infectados com *L. chagasi*: Animais experimentalmente infectados (n=10), $R^2 = 0,2783$

5.5 Mastócitos

A contagem de mastócitos, corados pela técnica Dominici, foi feita somente em algumas amostras de cada grupo. Não houve diferença estatística significativa entre a microscopia óptica e a morfometria na contagem dessas células e a coloração Dominici, sem pH controlado, ofereceu uma visualização melhor dos mastócitos.

Em relação ao número de mastócitos, em todos os grupos avaliados, a diferença estatística foi significativamente inferior para os animais da área central em relação aos da área metropolitana, experimentalmente infectados e controles (GRÁF. 11). Quando se comparou o número dessas células em cães sintomáticos e assintomáticos, apenas no grupo da área central houve diferença estatística significativa (GRÁF. 12). O teste de correlação entre mastócitos e inflamação foi positivo somente nos animais experimentalmente infectados (GRÁF. 13).

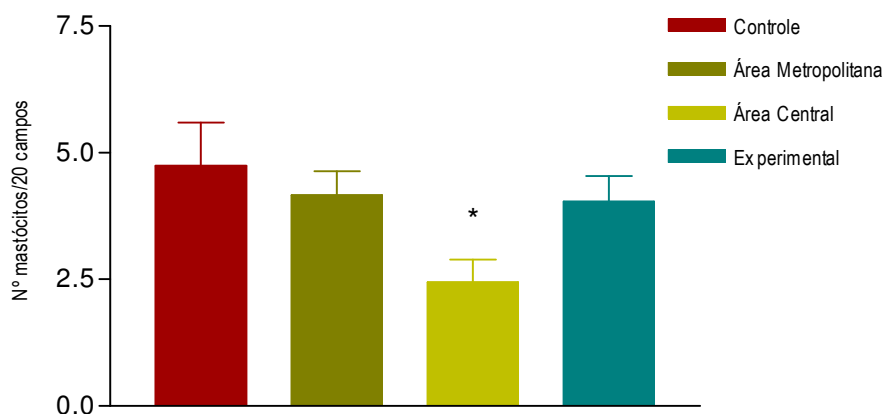


GRÁFICO 11- Comparação do número de mastócitos da derme nos diferentes grupos analisados: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentalmente infectados (n=10). *diferença estatística entre cães da área central e os demais $p < 0,001$

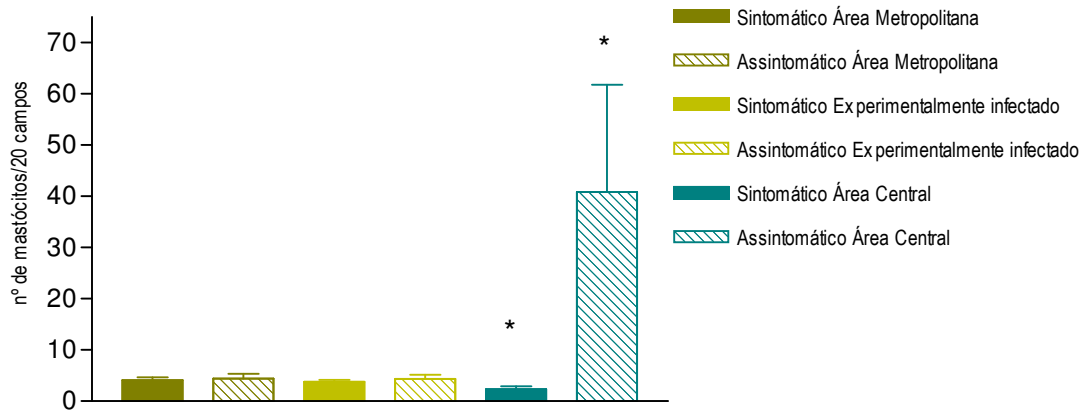


GRÁFICO 12- Comparação do número de mastócitos da derme de cães assintomáticos e sintomáticos: Área Metropolitana (n=55); Área Central (n=53) e Animais Experimentalmente infectados (n=10). *diferença estatística entre cães da área central e os demais $p < 0,05$

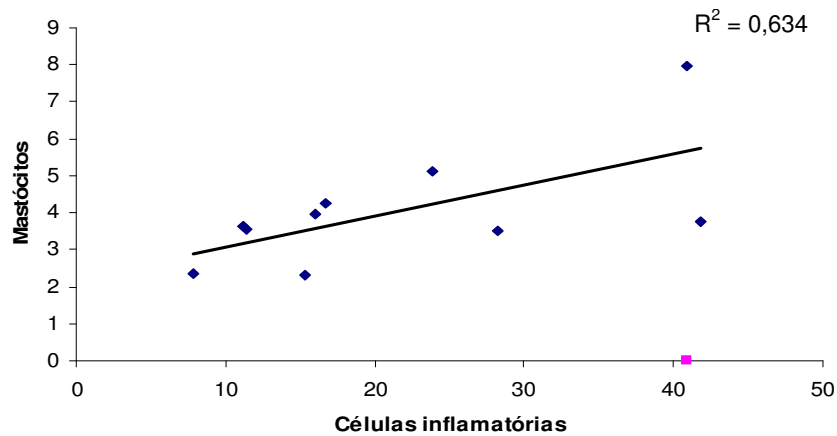


GRÁFICO 13- Correlação entre o número de mastócitos e células inflamatórias: Animais Experimentalmente infectados (n=10), $R^2 = 0,634$

6.0 Discussão

A leishmaniose visceral americana (LVA) foi primeiramente reconhecida nas Américas por Migone em 1913, no Paraguai, por Mazza e Cornejo em 1926 na Argentina (DEANE, 1956) e no Brasil em 1934, por Penna (CHAGAS et al., 1938). Até antes de 1980 era considerada uma zoonose de caráter epidemiológico estritamente rural. Todavia, a partir dos relatos de COSTA et al. (1990), os quais descreveram 55 casos da doença na cidade de Teresina, Piauí, um processo de urbanização da doença começou a ser desenhado. De fato, nos anos seguintes esse processo de urbanização pode ser verificado em grandes cidades brasileiras como São Luiz (COSTA et al. 1995), Natal (JERÔNIMO et al., 1994), Belo Horizonte (MICHALICK, 1993; SILVA et al. 2001), Rio de Janeiro (MARZOCHI et al. 1885) dentre outras como Fortaleza, Corumbá, Campo Grande, Aracaju, Araçatuba (Ministério da Saúde, 2007). Atualmente o cão tem sido considerado o principal reservatório urbano de *Leishmania (Leishmania) chagasi* e desempenha um papel central no ciclo de transmissão para o inseto flebotomíneo e desse para humanos, o que torna a LVC não só um problema veterinário, mas também um problema de saúde pública (DEANE e DEANE, 1962; TESH, 1995; ASHFORD, 2000; ALVAR, 2004).

No atual estudo, os cães que obtiveram resultado positivo, quando da avaliação pela técnica de imuno-histoquímica, foram clinicamente classificados de acordo com LIMA et al. (2007) em assintomáticos, na ausência de sinais clínicos, representados por 29 cães e em sintomáticos, quando apresentavam pelo menos um sinal clínico sugestivo da doença, representados por 89 animais.

Considerando os aspectos clínicos de todos os animais infectados, cães sintomáticos foram mais frequentemente observados do que assintomáticos, 75,5% e 24,5%, respectivamente. Ao comparar os animais naturalmente com os experimentalmente infectados, os primeiros apresentaram mais lesões específicas da doença. Um cenário distinto foi observado em animais experimentalmente infectados, haja visto que apenas três cães (30%) desenvolveram sinais clínicos da doença, como linfadenopatia e lesões na pele, essa última em apenas um animal.

Em relação ao material escolhido para o estudo, ou seja, a pele de orelha, observa-se que esse tecido é amplamente utilizado para diagnóstico, visto que a

detecção direta do parasito, em biopsia de pele, pode ser obtida através de um procedimento cirúrgico extremamente simples (TAFURI et al., 2004). XAVIER et al. (2006), por exemplo, demonstraram que amostras de pele da orelha, espelho nasal e abdômen são potencialmente utilizadas para diagnóstico da LVC independente do estado clínico do cão. Esse trabalho sugere uma distribuição desigual do parasitismo na pele dos cães e relata uma maior incidência na pele da orelha. De forma semelhante, o trabalho de MOURA et al. (2008) mostrou que essa apresenta-se mais parasitada, principalmente no seu terço superior, com alterações inflamatórias mais pronunciadas do que aquelas observadas no espelho nasal, como descritas por XAVIER et al. (2006). Tais resultados podem estar relacionados com o fato da orelha ser alvo frequente de injúrias e auto-traumatismos, os quais podem estimular o prurido induzindo, dessa forma, acúmulo de células inflamatórias que podem contribuir com a manutenção do parasitismo (MURRAY et al. 1982; TAFURI et al., 2000). Outro fato a ser considerado é a possibilidade de áreas mais frias do corpo, como a orelha, representar um local mais apropriado para a localização ou reprodução do parasito *Leishmania* (TRAVI et al., 2001).

Linfadenopatia foi a alteração clínica mais observada, tanto nos animais naturalmente infectados, independente de sua origem, quanto nos experimentalmente infectados. O linfonodo cervical superficial é o primeiro sítio envolvido na disseminação do parasito em cães naturalmente infectados, como relatado por LIMA et al. (2004) e COSTA et al. (2008) no Brasil e CIARAMELLA et al. (1997) na Itália. De acordo com COSTA et al. (2008), esses linfonodos estão diretamente relacionados com lesões faciais presentes na LVC.

Seguido pela linfadenopatia, dermatite esfoliativa foi a manifestação cutânea mais comum estando associada com áreas de alopecia, as quais usualmente se iniciavam na cabeça, principalmente região da orelha e periocular e se estendendo para o restante do corpo. Esses achados concordam com estudo de SARIDOMICHELAKIS et al. (2007), os quais consideram que a lesão de pele é a manifestação clínica mais comum da LVC no Mediterrâneo. Entretanto, esses autores também relataram que escoriações excessivas podem ou não estar acompanhadas por alopecia, como também notado por MARZOCHI et al. (1985); KOUTINAS et al. (1993); SLAPPENDEL e FERRER (1998). Segundo HOMMEL et al. (1978), a perda de pêlo tem sido explicada pela ação direta da *Leishmania*

sobre o folículo piloso, por um distúrbio do metabolismo do ácido pantotênico, devido às lesões hepáticas ou ainda, por deposição de imuno-complexos na membrana basal da pele induzindo a um processo auto-imune que desencadeia a alopecia. Portanto, avaliar as alterações cutâneas torna-se importante devido a suas influências na transmissão da doença. Em cães susceptíveis, a infecção localizada na pele segue a disseminação do parasito através dos histiócitos e células de Langerhans para os linfonodos, medula óssea, baço, fígado, rins, pulmões, trato gastrointestinal e menos frequentemente para o sangue (VIDOR et al., 1991; SLAPPENDEL e GRENE, 1990 e SEMIÃO-SANTOS, 1995).

O alongamento anormal das unhas, onicogribose, foi outro quadro observado em nossos cães. Essa alteração tem sido explicada pela presença de formas amastigotas na matriz ungueal, que estariam estimulando essa região (LESTOQUARD e DONATIEN, 1936); já outros autores admitem que a apatia do cão seria o grande responsável pela diminuição do desgaste natural das unhas (MARZOCHI et al., 1985 e GENARO, 1993).

O emagrecimento é um dos sinais mais relatados nos cães naturalmente infectados na LV (ALENCAR, 1959; MARZOCHI et al., 1985, LIMA et al., 2004) também observado por LANOTTE et al. (1979) e GENARO (1993) em cães experimentalmente infectados. Para alguns autores, o emagrecimento é atribuído à infiltração dos parasitos na mucosa do aparelho digestivo ou devido ao desequilíbrio protéico que induz a uma albuminúria, podendo ser revertida com a ingestão de alimentos, principalmente carne (ADLER, 1964). Segundo KEENAN et al. (1984) a caquexia pode ser ocasionada por uma deficiência de triptofano no organismo do animal, devido a uma competição alimentar do parasito com o hospedeiro por esse aminoácido. A perda de peso e a atrofia muscular indicam acometimento visceral, podendo estar associados à insuficiência renal, poliúria, polidipsia e emese (CABASSU et al., 1988). Em nosso estudo, escore corporal abaixo do normal foi uma das características clínicas mais observada nos cães.

Infiltrado inflamatório foi observado na pele de 51 dos 55 cães naturalmente infectados da área metropolitana (92,7%), em 45 dos 53 da área central (84,9%) e em quatro dos dez cães experimentalmente infectados (40%). Considerando os cães naturalmente infectados, nossos resultados concordam com os de Dos-SANTOS et al. (2004) que encontraram dermatite crônica na pele de orelha de 93% dos cães no município de Jacobina-Bahia, nordeste do Brasil.

Também observamos que a dermatite foi mais frequente em cães sintomáticos em relação aos assintomáticos, concordando com estudos de GIUNCHETTI et al. (2006) e XAVIER et al. (2006) no Brasil e SOLANO-GALLEGO et al. (2004) na Espanha. Entretanto, a intensidade da inflamação foi mais elevada na pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania* do que nos animais experimentalmente infectados.

Sobre a análise histológica em geral, a dermatite crônica foi caracterizada por um infiltrado de células mononucleares, composto principalmente de macrófagos, seguido por plasmócitos e linfócitos, sendo difuso na derme superficial e em focos ao redor de vasos, glândulas e folículos pilosos na derme profunda. Ocasionalmente macrófagos epitelióides foram observados no infiltrado celular mononuclear, mas formação de granuloma não foi vista em nenhum caso, contrariando dados descritos por Dos-SANTOS et al. (2004), os quais observaram formação de granuloma de células epitelióides. Embora existam várias definições histológicas de inflamação granulomatosa (ADAMS, 1976; WILLIAMS e WILLIAMS, 1983; SHEFFIELD, 1990) muitos pesquisadores concordam que a estrutura de granuloma, induzido por um microrganismo, consiste de um núcleo de macrófagos fusionados, parasitados e rodeados por um invólucro de células mononucleares (MURRAY, 2001). Entretanto, em nosso estudo, a presença de granuloma na derme não foi observada, semelhante aos resultados encontrados nos estudos realizados por GIUNCHETTI et al. (2006), XAVIER et al. (2006) e MOURA et al. (2008). Contudo, em nosso estudo, encontramos células epitelióides, agregados de macrófagos ou mesmo células gigantes no infiltrado celular crônico, sendo que essas se apresentaram de forma difusa ou frouxamente agregadas, porém não circundadas por um invólucro de células mononucleares. Assim, considerando nosso material analisado, entendemos que não existe um modelo padrão de organização celular mononuclear típico de granuloma, como o descrito por Dos-SANTOS et al. (2004).

A associação entre formas amastigotas de *Leishmania* com granuloma pode ser explicada por dois mecanismos: (1) a chegada do parasito na pele, em um hospedeiro imunocompetente, inoculado pelo inseto vetor infectado ou através de macrófagos parasitados (LIARTE et al., 2001), o que iniciaria uma resposta imune celular com hipersensibilidade do tipo tardia e formação do granuloma; (2) disseminação de grande número de parasitos na pele, um possível evento tardio

na LV de cães susceptíveis, associada com um infiltrado inflamatório granulomatoso (MURRAY 2001). De fato, existem evidências que células epitelióides em granuloma secretam fatores que inibem a ativação de macrófagos e linfócitos, o que favoreceria a manutenção do parasito no tecido (BARRAL-NETO et al., 1995; MURRAY, 2001). MOZOS et al. (1999) hipotetizam ainda que na pele previamente lesionada, a *Leishmania* seja capaz de alterar o padrão inflamatório, levando à formação de granuloma ou o desenvolvimento de um infiltrado de macrófagos. Em geral, esses macrófagos estariam aumentados de volume, com citoplasma de aspecto vacuolado, morfologia essa tipicamente encontrada na leishmaniose visceral e/ou cutânea. Outro ponto relevante consiste no fato de que esses cães poderiam ser mais propensos a manter a carga parasitária.

Novos estudos são necessários para avaliar o tempo da infecção e o estágio imunológico dos animais para explicar quais mecanismos são responsáveis pela associação de granuloma com a carga parasitária em pele de cães com LV. O conhecimento a respeito da especificidade da resposta imunológica representa uma medida útil em possibilitar futuras intervenções no controle de transmissão da doença (TRAVI et al., 2001).

Plasmocitose é uma alteração histológica descrita em muitos órgãos, durante a infecção por *Leishmania*. Em nosso estudo observamo-na mais em cães da área metropolitana (73,6%) do que nos cães da área central (37,7%) de Belo Horizonte. Podemos inferir que esses cães, considerando suas precárias condições de sobrevivência, podem potencialmente estar mais expostos a uma ampla diversidade de antígenos, fato esse que corrobora nossos resultados. Além do mais, a presença de plasmocitose nos cães experimentalmente infectados foi sempre evidente, mas menos intensa do que nos cães naturalmente infectados.

Alterações epiteliais tais como hiperqueratose; hiperplasia epidérmica; exocitose; crostas; edema superficial; dermatite nodular, intersticial, perivascular e periglandular têm sido descritos na LVC e são semelhantes tanto na pele visualmente normal quanto na pele lesionada, dos mesmos cães (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005). Sendo assim, é importante ressaltar que em nosso estudo foram coletadas amostras de pele de orelha de regiões íntegras, de forma padronizada e que essas, quando analisadas histologicamente, apresentaram alterações como: hiperqueratose, acantose, parakeratose,

papilomatose e degeneração hidrópica. Isso confirma o estudo anterior, uma vez que as possíveis alterações histológicas independem do aspecto macroscópico do tecido. Outro ponto que corrobora nossos resultados consiste no fato de que a presença de células inflamatórias, em cães sem dermatite esfoliativa evidente, pode ser explicada pela hipótese de que lesões macroscópicas decorrem da infiltração de células inflamatórias após certo período de tempo (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005).

Reação inflamatória na pele foi evidenciada em cinco cães (20%) pertencentes ao grupo controle. A coloração histológica Good Pasture - Anexo A, foi realizada para investigar uma possível infecção por bactérias, sendo o resultado negativo. Assim, hipotetizamos que esse fato pode ser atribuído a uma variedade de condições, por exemplo, picadas de insetos, frequentes durante todo o ano em países tropicais, bem como traumas que podem ser originados durante brigas (PRATS e FERRER, 1995; MOZOS et al., 1999). Resultado semelhante ao nosso foi obtido por XAVIER et al. (2006), no qual a quantidade de células inflamatórias do grupo controle, animais com testes sorológicos negativos para *Leishmania*, foi significativamente menor em relação aos grupos de animais naturalmente infectados.

A respeito do parasitismo, FERRER et al. (1988), SOLANO-GALLEGO et al. (2001), TRAVI et al. (2001) e MOURA et al. (2008) observaram que formas amastigotas são mais frequentemente encontradas na derme superficial ou na interface superficial-profunda. Em nosso trabalho a imunomarcagem de amastigotas pôde ser observada na derme superficial e profunda, ao redor de anexos e vasos. Houve, entretanto, uma concentração maior dessas imunomarcações nas porções mais superficiais da derme e em apenas dois casos (1,9%) foi observada no citoplasma de células da epiderme. SARIDOMICHELAKIS et al. (2007), em estudos histológicos com pele do espelho nasal de cães com LV, assintomáticos, discutiram a localização das formas amastigotas na derme desses animais. Observou-se que, em 100% dos casos, amastigotas foram encontradas na profundidade de 0,54 mm, o que caracteriza a derme superficial. Isso somado ao alcance “coincidente” da probóscide de flebotomíneos, quando do repasto sanguíneo, corrobora o papel epidemiológico do cão na transmissão da *Leishmania*, ao passo que na espécie humana a maior incidência desse parasito ocorre na profundidade de 1,0 mm.

Um fato importante encontrado, no presente trabalho, foi que os cães assintomáticos da área central de Belo Horizonte albergam mais parasitos na pele da orelha do que os cães assintomáticos da área metropolitana e experimentalmente infectados. Sugerimos que embora cães da área central vivam em condições melhores de vida do que os da área metropolitana, isso não exclui sua importância na dimensão epidemiológica da doença. Além do mais, acreditamos que esse dado seja importante, pois remete ao processo de urbanização da infecção por *Leishmania* em muitas cidades brasileiras, como exemplificado por MARGONARI et al. (2006) no município de Belo Horizonte. Isso sugere uma expansão silenciosa do número de cães infectados residentes em locais nobres da capital mineira, desvinculando da hipótese de que somente animais residentes de áreas pouco favorecidas estariam mais propensos a infecções. Esses dados também reforçam a idéia que cães assintomáticos apresentam parasitos na pele tanto quanto os sintomáticos, remetendo, dessa forma, à sua importância epidemiológica no ciclo da LV, como discutido por ABRANCHES et al. (1998) em Portugal; SOLANO-GALLEGO et al. (2001) na Espanha; DEANE et al. (1955), LIMA et al. (2004), XAVIER et al. (2006), Da-COSTA-VAL et al. (2007) e MICHALSKY et al. (2007) no Brasil. MOLINA et al. (1994), avaliando a sintomatologia clínica de cães naturalmente infectados e capacidade infectiva, verificaram que três de cinco cães assintomáticos bem como todos os cães sintomáticos foram capazes de infectar o inseto vetor quando do repasto sanguíneo. Dessa forma, concluíram que estudos epidemiológicos podem estar subestimados, uma vez que apenas os cães com sintomatologia são incluídos nos inquéritos sorológicos.

Além disso, é importante o fato de que cães assintomáticos possam albergar formas amastigotas sem, necessariamente, apresentar lesões macroscópicas na pele, dado esse também relatado por ADLER e THEODOR (1931) em países do Mediterrâneo e por DEANE et al. (1955) no Brasil, culminando esses últimos, posteriormente, com importante estudo epidemiológico no nordeste do país. De acordo com ADLER e THEODOR (1931), as ulcerações com infecções secundárias podem interferir negativamente no estabelecimento da infecção por *Leishmania* no hospedeiro vertebrado.

Segundo SACKS e SHER (2002), embora o parasito tenha alguns paradigmas mais estudados atualmente, que consistem na evasão da imunidade

mediada por células T e anticorpos, uma série de adaptações importantes ocorre durante o estabelecimento inicial da infecção, quando o parasito invasor se confronta com o sistema imune inato. Essa defesa inata do hospedeiro inclui a barreira epitelial da pele; a cascata alternativa do complemento e outros componentes líticos séricos; hidrolases lisossomais; metabólicos tóxicos do oxigênio de fagócitos mononucleares; apresentação de antígeno e funções imuno-regulatórias de células dendríticas, as quais providenciam uma ligação crucial com a resposta imune adaptativa.

Estudos têm mostrado que cães naturalmente infectados assintomáticos são capazes de desenvolver uma resposta imune tanto humoral quanto celular específica (PINELLI et al., 1994). Em particular, células T de cães assintomáticos têm se mostrado capazes de produzir níveis significativamente mais elevados de IL-2 e TNF em resposta ao antígeno *Leishmania*, quando comparados aos dos cães sintomáticos e não infectados (PINELLI et al., 2000). SANCHES et al. (2004), sugerem que nos cães naturalmente infectados assintomáticos haja um controle mais eficiente da replicação dos parasitos, especialmente pelo desconhecimento exato do tempo de infecção, como em nosso estudo.

A carga parasitária nos cães experimentalmente infectados foi estatisticamente inferior àquela encontrada nos naturalmente infectados. Embora nem sempre detectado na pele, quando da realização da técnica de imunohistoquímica, provavelmente devido à reduzida densidade parasitária local e/ou disseminação para outros órgãos, a possibilidade do parasito permanecer no animal e proporcionar estimulação imune contínua pode ser considerado. Uma carga parasitária reduzida foi também observada por TAFURI et al. (1996) e SAMPAIO et al. (2007) não só na pele, como também no fígado e baço em cães experimentalmente infectados.

Em nosso estudo, três dos dez cães experimentalmente infectados manifestaram pelo menos um sinal clínico sugestivo de LV, embora todos eles tenham sido infectados com sucesso, como confirmado pela técnica PCR (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que a inoculação de formas promastigotas cultivadas de *L. chagasi* apresenta, no curso da infecção, algum grau de resistência na mudança para forma amastigota, como observado em modelo canino e em hamster por REQUENA et al. (2000), além disso, SOLANO-GALLEGO et al. (2000) sugerem que diferenças genéticas individuais dos cães

podem ser responsáveis por essa variação. Essas diferenças, quanto ao aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença, podem estar relacionadas à ativação de diferentes respostas imunes, intrínsecas a cada animal ou a uma longa fase pós-infecção para que ocorra a conversão de assintomático para sintomático (SLAPPENDEL e FERRER, 1998).

O uso do modelo canino experimental na LV permite o estudo longitudinal e análise de estágios assintomáticos da doença. Além do mais, o recente desenvolvimento de reagentes e imunomarcadores específicos para cães possibilitam melhor monitoramento da progressão da doença (MORENO e ALVAR, 2002).

Resultados obtidos por CAMPINO et al. (2000), sugerem que, em geral, cães experimentalmente infectados com cultura de formas promastigotas desenvolvem uma infecção assintomática, enquanto aqueles inoculados com formas amastigotas desenvolvem uma infecção sintomática. Mas, tal como em nossos resultados, eles asseguram que a presença de parasitos em tecidos indica que esses animais, embora assintomáticos, foram infectados.

Dentre os fatores que afetam o sucesso e a progressão da infecção experimental estão incluídos: rota de inoculação, tamanho do inoculo e o estágio do parasito (MORENO e ALVAR, 2002). Além do mais, flebotomíneos não são simplesmente ferramentas que inoculam o patógeno. O avanço atual nas pesquisas biomédicas foca o papel da saliva na transmissão da leishmaniose e tem mostrado a presença de um relacionamento co-evolucionário entre esses vetores e o patógeno que eles transmitem. O papel dos componentes salivares do inseto vetor no estabelecimento de infecção por *Leishmania*, tem se tornado mais claro, abrindo novas perspectivas para o controle da doença. Esses componentes mediadores com atividades sinérgicas promovem um micro-ambiente favorável para um adequado suprimento sanguíneo e podem também ser importantes para o estabelecimento do parasito. Saliva de *Lutzomyia longipalpis* induz rapidamente expressão da quimiocina CCL2/MCP-1 que promove o recrutamento de macrófagos para o sítio de inoculação, em modelo murino de inflamação. A presença de macrófagos nesse microambiente, no qual também contém fatores imunomodulatórios salivares, pode favorecer o estabelecimento da infecção caso tais células hospedeiras não sejam adequadamente ativadas (TEIXEIRA et al., 2005; ANDERSON et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006). A manipulação do

equilíbrio fisiológico das funções sanguíneas que favorece, conseqüentemente, a formação do “pool” hemorrágico representa outra característica das moléculas farmacologicamente ativas da saliva, que são representadas por fatores anticoagulantes, anti-agregadores plaquetários, vasodilatadores, antiinflamatórios e imuno-modulatórios. Essa também favorece a transferência e capacitação dos parasitos, promovendo assim sua evasão da resposta imune do hospedeiro. Tais mecanismos estão atrelados ao sucesso da infecção (ANDRADE et al., 2007).

Assim, a caracterização de componentes salivares tem se tornado necessária para melhor entendimento da patogênese da doença e desenvolvimento de novas estratégias objetivando o bloqueio da transmissão do parasito (TEIXEIRA et al., 2005; ANDERSON et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006).

AEBISCHER et al. (1993) observaram, em cães infectados, a manutenção do parasito sem no entanto ocorrer desenvolvimento da doença. Segundo MORENO e ALVAR et al. (2002), após a infecção, alguns cães desenvolvem a doença em curto prazo apresentando um quadro progressivo, ao passo que outros controlam a disseminação do parasito desenvolvendo a doença em curto ou longo prazo, podendo esse período se estender por anos. Além do mais, o progresso da infecção experimental parece refletir a diversidade da resposta imunológica e clínica observada na natureza.

Correlação positiva, porém fraca, foi observada entre a densidade parasitária e a reação inflamatória crônica. Parasitismo tecidual intenso sem reação inflamatória ou vice-versa foi encontrado. Verificamos que infiltrado inflamatório representa achado histológico comum na pele de cães de área tropical, independente de evidências de infecção pela *Leishmania* ou de outros parasitos, como observado em 20% dos cães pertencentes ao grupo controle. Assim, é sabido que a presença de *Leishmania* na pele de cão, no curso da LV, não está necessariamente associada com um quadro inflamatório. Entretanto, quando esse está presente é caracterizado por células da inflamação crônica, com predominância de macrófagos. O papel duplo dessas células, representado pelo transporte para outros órgãos e eliminação dos parasitos devido a sua atividade leishmanicida, pode explicar a falta de correlação entre a densidade parasitária e a gravidade do infiltrado inflamatório (BARRAL-NETTO et al., 1995; LEMOS DE SOUZA et al., 2000; TAFURI et al., 2000; MURRAY et al., 2001; XAVIER et al., 2006).

A falta de associação entre a inflamação e o parasitismo provavelmente está relacionada com o tipo de resposta imune apresentada pelo animal. Animais que apresentam um padrão de resposta com predomínio do subtipo Th1, que conduz uma resposta do tipo celular, são capazes de eliminar a *Leishmania*, podendo apresentar uma resposta inflamatória com infiltrado mononuclear, grande número de macrófagos ativados, porém sem parasitos. Por outro lado, animais que apresentam uma resposta do subtipo Th2, que conduz uma resposta humoral, podem estar intensamente parasitados (TAPIA et al., 1994; MARTINEZ-MORENO et al., 1995; FONDEVILA et al., 1997). FERRER et al. (1988) defendem que a carga parasitária na pele e a cronicidade das lesões cutâneas podem ter uma correlação inversa. Entretanto, a dicotomia das respostas Th1 e Th2, as quais induzem a resistência e susceptibilidade, respectivamente, não é absoluta. Fica claro então, que a defesa contra a LV está relacionada com a habilidade do hospedeiro em montar uma resposta imune capaz de controlar e/ou eliminar o parasito (LOHOFF et al., 1998).

Sabemos que a infecção por *Leishmania* é caracterizada pela infiltração principalmente de macrófagos e linfócitos, com presença de alguns neutrófilos e eosinófilos. Embora o papel desempenhado por outras células na LV seja conhecido, o do mastócito ainda não está bem estabelecido. Estudo realizado com camundongos resistentes (C57BL/6) e susceptíveis (BALB/c) demonstrou que protozoários do gênero *Leishmania* regulam a infiltração dos mastócitos para o sítio de inoculação, além de afetarem sua produção e função. Observações sugerem que citocinas derivadas de mastócitos desempenham papel pró-parasito nos animais susceptíveis e anti-parasito naqueles resistentes. Mastócitos sensibilizados pela IgE podem produzir TNF- α e IL-4, citocinas que promovem a proteção ou susceptibilidade, respectivamente, sendo que a primeira apresenta capacidade de recrutar neutrófilos para o sítio de infecção e além disso, são capazes de secretar outros mediadores como a IL-3 e histamina (SAHA et al., 2004) e IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ (BIDRI et al., 1997). Esses dados sugerem que os mastócitos, quando devidamente estimulados, são capazes de produzir citocinas tanto do subtipo Th1 quanto do Th2. Dados referentes ao papel dos mastócitos na LV, utilizando modelo canino, não foram encontrados.

A respeito da técnica de imuno-histoquímica verificamos que a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* nas biopsias de pele, a partir da utilização da

técnica da estreptoavidina peroxidase, foi eficaz. FERRER et al. (1991) e TAFURI et al. (2004) também observaram uma eficiente detecção de formas amastigotas a partir do emprego da técnica da estreptoavidina peroxidase e citam que os procedimentos imuno-histoquímicos são de considerável valor para o diagnóstico definitivo da infecção. Somado a isso, representa ferramenta alternativa eficiente e barata, pois em seu protocolo, é utilizado como anticorpo primário, soro de cães naturalmente infectados com *Leishmania*, de fácil obtenção. Dessa forma essa técnica apresenta relevante potencial para estudos epidemiológicos, clínicos e patológicos.

Paralelamente às avaliações inerentes ao projeto, foi realizada a técnica da PCR em 40 biopsias de pele de cães, suspeitos de estarem infectados, que obtiveram resultado negativo quando submetidos à reação de imuno-histoquímica. Essa técnica foi realizada em fragmentos de pele emblocados em parafina. Como resultado foi verificado que a PCR apresentou-se mais sensível no diagnóstico da LV, sendo positiva em 17 das 40 biopsias (42,5%) (dados não apresentados). Esses resultados são corroborados por XAVIER et al. (2006) e SOLANO-GALLEGO et al. (2001 e 2004) que sugerem que a PCR de pele seja mais sensível no diagnóstico precoce e na detecção de níveis residuais da *Leishmania*, quando comparada a outras técnicas como a de imuno-histoquímica.

A PCR representa uma técnica altamente sensível e específica (CORTES et al., 2004), entretanto, sua limitação para uso em inquéritos epidemiológicos se fundamenta no custo, disponibilidade de reagentes, equipamentos e pouca adaptabilidade do método ao campo (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

7.0 Conclusões

A densidade parasitária na pele está relacionada com o modelo de infecção utilizado, uma vez que valores significativamente reduzidos foram observados nos cães experimentalmente infectados quando comparados aos dos naturalmente infectados;

O padrão inflamatório na pele, contrariamente à sua intensidade, não deve ser utilizado como característica patognomônica da infecção pela *L. chagasi*, uma vez que nos cães naturalmente infectados foi observado o mesmo padrão descrito nos experimentalmente infectados, como também, nos cães controle, porém com intensidade significativamente mais elevada;

O encontro de significativa carga parasitária nos cães assintomáticos, residentes da área central de Belo Horizonte, remete a seu potencial papel na epidemiologia da LV;

A microscopia óptica mostrou-se tão sensível quanto a morfometria na quantificação das formas amastigotas de *Leishmania* na pele;

A correlação entre a ocorrência de lesões inflamatórias na pele, associada à presença de formas amastigotas de *Leishmania*, com o quadro clínico do cão, não está relacionada com o modelo de infecção utilizado, visto que tanto nos animais naturalmente quanto nos experimentalmente infectados essa correlação foi fraca.

8.0 Referências Bibliográficas

ABRANCHES, P. L.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G. M. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. *Acta Med Port*, v.11, n.10, Oct, p.871-5, 1998.

ADAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am J Pathol*, v. 84, n.1, p.164-192, 1976.

ADLER, S. e THEODOR, O. Skin infection in canine visceral leishmaniasis. *Brit M J*, v.2, p.1179, 1931.

ADLER, S. e THEODOR, O. Investigations on mediterranean kala azar VII-X. *Proc Royal Soc, Series B*, v.116, p.494-544, 1935.

ADLER, S. *Leishmania*. In: Advances in parasitology. *New York, Academic Press*, v.2, p. 35-96, 1964.

AEBISCHER, T.; MOODY, S. F.; HANDMAN, E. Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun*, v.61, n.1, p.220-6, 1993.

ALENCAR, J.E. Aspectos clínicos do calazar americano. *Ver Brás Malariol Doenças Trop*, v.11, p.19-44, 1959.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*, v.112, n 18, Sep, p.2993-3002, 1999.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J. ; NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, v.57, p.1-88, 2004.

ALVES, W. A. e BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, v.20, n.1, p.259-265, 2004.

ANDERSON, J. M.; OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S.; MANS, B. J.; REYNOSO, D.; SEITZ, A. E.; LAWYER, P.; GARFIELD, M.; PHAM, M.; VALENZUELA, J. G. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*, v.7, p.52, 2006.

ANDRADE, Z. A. e ANDRADE, S. G. Some new aspects of the kala-azar pathology. (Morphologic study of 13 autopsy cases). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.8, n.6, Nov-Dec, p.259-66, 1966.

ANDRADE, B. B.; OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETTO, M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: Current insights. *Scand J Immunol* v.66, n. 2-3, p.122-127, 2007.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO, P. S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*, v.2, n.2, Apr-Jun, p.145-6, 1996.

ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v.30, n.12-13, Nov, p.1269-81, 2000.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, v. 24, n.7, May, p.324-330, 2008.

BARRAL-NETTO, M.; DA SILVA, J.S.; BARRAL, A.; REED, S. Up-regulation of T helper 2 and down-regulation of T helper 1 cytokines during murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome enhances susceptibility of a resistant mouse strain to *Leishmania amazonensis*. *Am J Pathol*, v.146, n.3, p.635-642, 1995.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*, v.28, n.7, Jul, p.329-37, 2006.

BIDRI, M. I.; VOULDOUKIS, I. ; MOSSALAYI, M. D.; DEBRE, P.; GUILLOSSON, J. J.; MAZIER, D. ; AROCK, M. Evidence for direct interaction between mast cells and *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol*, v.19, n.10, Oct, p.475-83, 1997.

BIEDERMANN, T.; ZIMMERMANN, S. HIMMELRICH, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; SAKRAUSKI, A. K.; SEEGMULLER, I.; VOIGT, H.; LAUNOIS, P.; LEVINE, A. D.; WAGNER, H.; HEEG, K.; LOUIS, J. A.; ROCKEN, M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol*, v.2, n.11, Nov, p.1054-60, 2001.

BOGLIOLO, L. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência a fibrose hepática leishmaniótica. *O Hospital*, v. 3, p. 101, 1956.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C. ; MAGNOL, J. P. ; SAINT-ANDRE, I. ; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.56, n.3-4, May, p.345-51, 1997.

CABASSU, J. P.; GERVAIS, P. ; SEGURET, N. Manifestations cliniques de La leishmaniose canine. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, v.23, p.29-34, 1988.

CALIARI, M.V. Princípios de morfometria digital: Ks300 para iniciantes. Editora da UFMG, 148p, 1997.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. i. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.6, p.93-100, 1964.

CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G.; RIÇA-CAPELA, M.; CORTES, S.; ABRANCHES, P. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania*

infantum in a canine model for leishmaniosis. *Vet Parasitol* v.92, n.4, p.269-275, 2000.

CARDOSO, L.; NETO, F.; SOUSA, J. C.; RODRIGUES, M.; CABRAL, M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol*, v.79, n.3, Nov 16, p.213-20, 1998.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L. M.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N.; PAUMGARTEN, M. J. V.; SÁ, B. Leishmaniose visceral americana. Relatórios dos trabalhos da comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral americana em 1937. *Men. Inst. Osw. Cruz*, v. 33, p. 89-229, 1938.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.103, n.1-2, Jan 10, p.67-75, 2005.

CHANG, K. P. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg*, v.30, n.2, Mar, p.322-33, 1981.

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

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.98, n.1, p.12-17, 2004.

COSTA, C.H.; PEREIRA, H.F.; ARAÚJO, M.V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986. *Ver Saúde Pública*, v.24, n.5, p.361-72, 1990.

COSTA, J.M.; VIANA, G.M.; SALDANHA, A.C.; NASCIMENTO, M.D.; ALVIM, A.C.; BURATTINI, M.N.; SILVA, A.R. Visceral leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil: evolution of an epidemic. *Cad Saúde Pública*, v.11, n.2, p.321-4, 1995.

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.24, n. 12, p.2959-2963, dez, 2008.

COSTA, M.M.; LIMA, W.G.; FIGUEIREDO, M.M.; MICHALICK, M.S.M; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Vet Pathol*, v.45, p.613-616, 2008.

COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. *Leishmania donovani* infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. *Eur J Immunol*, v.29, n.1, Jan, p.203-14, 1999.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol*, v.72, n.2, Apr, p.132-41, 2002.

DA COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M. S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*, v.174, n.3, Nov, p.636-43, 2007.

DE ALMEIDA, M. C. Infective inoculum for *Leishmania*. *Trends Parasitol*, v.18, n.4, Apr, p.154-5, 2002.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.98, n.7, Oct, p.861-70, 2003.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; ALENCAR, J. E. Control of *Phlebotomus longipalpis* by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceará. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*, v.7, n.1, Jan, p.131-41, 1955.

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil. Serviço nacional de educação sanitária, Rio de Janeiro, p.1-162, 1956.

DEANE, L. M. e DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.4, May-Jun, p.198-212, 1962.

DEPLAZES, P.; SMITH, N. C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol*, v.17, n.9, Sep, p.451-8, 1995.

DESCOTEAUX, A. e TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta*, v.1455, n.2-3, Oct 8, p.341-52, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.27, n.5, Sep, p.305-18, 2004.

DOMINGUEZ, M. e TORANO, A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *J Exp Med*, v.189, n.1, Jan 4, p.25-35, 1999.

DOMINGUEZ, M.; MORENO, I. LOPEZ-TRASCASA, M.; TORANO, A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J Exp Med*, v.195, n.4, Feb 18, p.451-9, 2002.

DOS-SANTOS, W.L.; DAVID, J.; BADARO, R.; DE-FREITAS, L.A. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*, v.92, n.2, p.89-94, 2004.

DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin Dermatol*, v.14, n.5, Sep-Oct, p.425-31, 1996.

FERRER, L.; RABANAL, R. M. ; DOMINGO, M.; RAMOS, J. A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*, v.44, n.2, Mar, p.194-6, 1988.

FERRER, L.; JUANOLA, B.; RAMOS, J. A. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol*, v.28, n.4, p.342-343, 1991.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec*, v.136, n.20, May, p.514-6, 1995.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: canine leishmaniasis: an update, 1, Barcelona. Proceedings of the international canine leishmaniasis forum. *Sumène: Hoeschst Roussel Vet*, Agosto, p.6-10, 1999.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERR, L. Epidermal immuno-competence in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.56, n.3-4, p.319-327, 1997.

GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, v.6, n.2, p.135-142, 2005.

GANTT, K. R.; GOLDMAN, T. L.; MCCORMICK, M. L.; MILLER, M. A.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, E. T.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol*, v.167, n.2, Jul 15, p.893-901, 2001.

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

GILLESPIE, R.D.; MBOW, M.L.; TITUS, R.G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol*, v.22, p.319-331, 2000.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Relation between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Path*, v.135, n.2-3, p.100-107, 2006.

GOMES-PEREIRA, S.; RODRIGUES, O. R.; ROLÃO, N.; ALMEIDA, P. D.; SANTOS-GOMES, G. M. Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF-beta production. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v.41, n.1, May 1, p.59-68, 2004.

GRIMALDI, G.J.R. e TESH, R.B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, v.6, n.3, p.230-50, 1993.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, v.2, n.8, Aug, p.494-501, 2002.

HILL, J.O.; AWWAD, M.; NORTH, R.J. Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. *J Exp Med*, v.169, p.1819-1827, 1989.

HIRSCH, C. S.; ELLNER, J. J.; BLINKHORN; TOOSI, Z. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against *Mycobacterium tuberculosis* by natural inhibitors of transforming growth factor β . *Proc Natl Acad Sci*, v.94, n.8, p.3926-31, 1997.

HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, v.72, n.3, p.213-218, 1978.

JERÔNIMO, S.M.; OLIVEIRA, R.M.; MCKAY, S.; COSTA, R.M.; SWEET, J. ; NASCIMENTO, E.T. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.88, n.4, p.386-8, 1994.

KANE, M. M. e MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol*, v.7, n.1, Jan, p.26-31, 2000.

KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L. D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H. K.; JOHNSON, A. J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathol*, v.21, n.1, Jan, p.74-9, 1984.

KEMP, K.; HVIID, L.; KHARAZMI, A.; KEMP, M. Interferon-gamma production by human T cells and natural killer cells in vitro in response to antigens from the two intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishmania major*. *Scand J Immunol*, v.46, n.5, Nov, p.495-9, 1997.

KHASKHELY, N. M.; MARUNO, M.; UEZATO, H.; TAKAMIYAGI, A.; RAMZI, S. T.; AL-KASEM, K. M.; KARIYA, K.; TODA, T.; HASHIGUCHI, Y.; GOMEZ LANDIRES, E. A.; NONAKA, S. Low-dose UVB contributes to host resistance against *Leishmania amazonensis* infection in mice through induction of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha cytokines. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.9, n.3, May, p.677-86, 2002.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*, v.4, n.1, Jan, p.1-24, 1990.

KIMA, P. E.; RUDDLE, N. H.; MCMAHON-PRATT, D. Presentation via the class I

pathway by *Leishmania amazonensis* – infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8+ T cells. *J Immunol*, v.159, p.1828-34, 1997.

KOUTINAS, A. e KOPTOPOULOS, G. Low prevalence of feline viral infections in northern Greece. *Vet Rec*, v.133, p.245-247, 1993.

LAGE, R. S.; OLIVEIRA, G. C.; BUSEK, S. U.; GUERRA, L. L.; GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, v.115, n.1-2, Jan 15, p.135-45, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; MILES, M. A.; POVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVII. Enzymic characterization of a *Leishmania* from the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (Edentata), from para state. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.76, n.6, p.810-11, 1982.

LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. *An Parasitol Hum Comp*, v.54, n.3, p.277-279, 1979.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ROMAO, P.; CORTES, S.; ROLÃO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RICA-CAPELA, M. J.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.79, n.3-4, May 30, p.273-84, 2001.

LEMONS-DE-SOUZA, V.; ASCENÇÃO-SOUZA, J.; CORREIA-SILVA, T.M.; SAMPAIO-TAVARES-VERAS, P.; RODRIGUES-DE-FREITAS, L.A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect*, v.2, n.15, p.1807-1815, 2000.

LESTOQUARD, F. e DONATIEN, A. Étude des *Leishmania* du derme cutanée. *Bull Soc Pathol Exot*, v.29, p.422-430, 1936.

LIARTE, D. B.; MENDONÇA, I.L.; LUZ, F. C. O.; ABREU, E. A. S.; MELLO, G. W. S.; FARIAS, T. J. C.; FERREIRA, A. F. B.; MILLINGTON, M. A.; COSTA, C. H. N. QBC for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis: preliminary data. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.34, n.6, p.577-581, 2001.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUK, R.; CHAN, W. L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol*, v.19, n.7, Jul, p.1227-32, 1989.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S.; DE MELO, M. N.; TAFURI, W. L. ; TAFURI, W L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop*, v.92, n.1, Sep, p.43-53, 2004.

LIMA, W.G.; OLIVEIRA, P.S.; CALIARI, M.V.; GONÇALVES, R.; MICHALICK,

M.S.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, v.117, n.1-2, p.129-136, 2007.

LOHOFF, M.; GESSNER, A.; BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. Experimental murine leishmaniasis and the Th1/Th2 cell concept. *Tokai J Exp Clin Med*, v.23, n.6, Dec, p.347-50, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

MARGONARI, C.; FREITAS, C.R.; RIBEIRO, R.C.; MOURA, A.C.; TIMBO, M.; GRIPP, A.H.; PESSANHA, J.E.; DIAS, E.S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101, p.31-38, 2006.

MARTINEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTINEZ-MORENO, F. J.; COSTA, I.; HERNANDEZ, S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.48, n.3-4, Oct, p.209-20, 1995.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALDI, J.R.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; RANGEL, J.R., TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. Brazil. Clinical, Parasitological, therapeutical and Epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.*, v.80, p.349-357, 1985.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R. ; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, v.16, n.5, May, p.188-9, 2000.

MAZZONI, A.; YOUNG, H. A.; SPITZER, J. H.; VISINTIN, A.; SEGAL, D. M. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest*, v.108, n.12, Dec, p.1865-73, 2001.

MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, Wg. L.; AGUIAR, S. S.; NASCIMENTO, P. H.; GENARO, O.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W. Spreading of visceral leishmaniasis in urban area of Belo Horizonte, MG, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.88, suppl. I, p.53, 1993.

MICHALSKY, E. M.; ROCHA, M. F.; DA ROCHA LIMA, A. C.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PIRES, M. Q.; OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; DOS SANTOS, S. L.; BARATA, R. A.; ROMANHA, A. J.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol*, v.147, n.1-2, p.67-76, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – disponível em <http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/visceral_2006.pdf> – acesso dia 23-01-2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tópicos de saúde: leishmaniose visceral. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22141> acesso em: 01-05-2007).

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALES, F.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.88, n.4, p.491-493, 1994.

MOLL, H. The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. *Adv Exp Med Biol*, v.479, p.163-73, 2000.

MOORE, K. J. e MATLASHEWSKI, G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol*, v.152, n.6, Mar 15, p.2930-7, 1994.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* v.71, p.181-195, 1999.

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

MORRIS, L.; TROUTT, A. B.; MCLEOD, K. S.; KELSO, A.; HANDMAN, E.; AEBISCHER, T. Interleukin-4 but not gamma interferon production correlates with the severity of murine cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*, Aug, v.61, n.8, p.3465-65, 1993.

MOSSER, D. M. e EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol*, v.135, n.4, Oct, p.2785-9, 1985.

MOSSER, D. M.; VLASSARA, H.; EDELSON, P. J.; CERAMI, A. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J Exp Med*, v.165, p.140-145, 1987.

MOURA, E.P.R.; SAMPAIO, R.R.; LIMA, W. M.; ALVES, W. G.; MELO, C. F.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S. M. Histopathological and parasitological analysis of skin tissues biopsies from two distinct anatomical areas of the ears of dogs. *Brazilian J Vet Pathol*, v.1, p.10-15, 2008.

MOZOS, E.; PEREZ, J.; DAY, M.J.; LUCENA, R.; GINEL, P.J. Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. *J Comp Pathol*, v.120, n.3, p.257-268, 1999.

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

MURRAY, H.W.; MASUR, H.; KEITLY, J.S. Cell mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine generation capacity. *J Immunol*, v.131, n.1, p.1487-91, 1982.

MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*, v.82, n.5, p.249-267, 2001.

NOBEN-TRAUTH, N.; KROPF, P.; MULLER, I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science*, v.271, n.5251, Feb 16, p.987-90, 1996.

OLIVEIRA, C.D.; ASSUNÇÃO, R.M.; REIS, I.A.; PROIETTI, F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro* v.17, p.1231-1239, 2001.

OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S.; SEITZ, A. E. From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine*, v.24, n.3, p.374-90, 2006.

PALMA, G. e GUTIERREZ, Y. Laboratory diagnosis of *Leishmania*. *Clin Lab_Med*, v.11, n.4, Dec, p.909-22, 1991.

PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; VLEMMAS, J.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, v.104, n.3-4, p.227-237, 2005.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*, v.62, n.1, p.229-335, 1994.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A. M. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol*, v.92, n.3, p.181-9, 2000.

PRATS, N. E. L. e FERRER, A. Possible mechanism in the pathogenesis of cutaneous lesions in canine leishmaniasis. *Vet Rec*, v.137, n.4, Jul 22, p.103-4, 1995.

QUEIROZ, P.V.; MONTEIRO, G.R.; MACEDO, V.P.; ROCHA, M.A.; BATISTA, L.M.; QUEIROZ, J.W.; JERÔNIMO, S.M.; XIMENES, M.F. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci, in press.*, 2008.

REINER, S. L. e LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*, v.13, p.151-77, 1995.

REIS, A.B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. 2001. 180f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, v.40, n.7, Jul, p.2352-6, 2002.

REQUENA, J. M.; SOTO, M.; DORIA, M. D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol*, v.76, n.3-4, p.269-281, 2000.

RIBEIRO, J. M. Vector salivation and parasite transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.82; Suppl 3, p.1-3, 1987.

ROSA, R.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O.R; SANTOS-GOMES, G.M. *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4+ and CD8+ T cells. *Acta Trop*, v.97, p.309-317, 2006.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on leishman's bodies. *Brit Med J*, v.2, p.1261-1401, 1903.

ROURA, X.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec*, v.144, n.10, Mar 6, p.262-4, 1999.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; ANJUERE, F.; FERRUA, B.; FRAGAKI, K.; LE FICHOUX, Y. ; KUBAR, J. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. *Eur Cytokine Netw*, v.12, n.2, Apr-Jun, p.340-7, 2001.

SACKS, D. e SHER. A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol*, v.3, n.11, Nov, p.1041-7, 2002.

SAHA, B.; TONKAL, A. M.; CROFT, S.; ROY, S. Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*, v.137, n.1, p.19-23, 2004.

SAMPAIO, W. M.; MOURA, E. P. ARRUDA, F. C.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; FERNANDES, A. P.; MICHALICK, M. S.; MELO, M. N.; TAFURI, W.

L.; TAFURI, W. L. In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *BMC Vet Res*, v.3, p.11, 2007.

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

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human genetics*, v.90, n.6, p.655-656, 1993.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.95, n.2, Mar-Apr, p.193-8, 2000.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; KOUTINAS, A.F.; OLIVRY, T.; DUNSTON, S.M.; FARMAKI, R.; KOUTINAS, C.K.; PETANIDES, T. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*, v.18, n.4, p.227-233, 2007.

SECRETARIA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE, disponível em <<http://www.pbh.gov.br/smsa/bhleishmaniose>> 2006. Acesso dia 23-01-2009.

SECRETARIA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE, disponível em <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=15624&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0&>, acesso dia 28-01-2009.

SEMIÃO-SANTOS, S. J. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol. Res.*, v.81, n.3, p.235-239, 1995.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of american visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101, n.5, Aug, p.577-9, 2006.

SHEFFIELD, E.A. The granulomatous inflammatory response. *J Pathol*, v.160, n.1, p.1-2, 1990.

SHREEDHAR, V.; GIESE, T.; SUNG, V. W.; ULLRICH, S. E. A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol*, v.160, n.8, Apr 15, p.3783-9, 1998.

SILVA, E.S. ; GONTIJO, C.M.; PACHECO, R.S. ; FIUZA, V.O.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.96, n.3, p.285-91, 2001.

SLAPPENDEL, R.J. e GRENE, C.E. Leishmaniasis. In: Greene. C.E. Ed.

Infectious diseases of the dog and cat. *Philadelphia: WB Saunders Co.*, p.769-777, 1990.

SLAPPENDEL, R.J.F. e FERRER, L. Leishmaniasis. In: infectious diseases of Dog and cat, C. E. Greene. *Saunders company, Philadelphia*, p.450-458, 1998.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, v.90, n.1-2, p.37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*, v.39, n.2, p.560-3, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol*, v.130, n.1, p.7-12, 2004.

SOLBACH, W. e LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. *Adv Immunol*, v.74, p.275-317, 2000.

SUNDAR, S. e RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.9, n.5, Sep, p.951-8, 2002.

TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, A.J.A.; MICHALICK, M.S.; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.38, p.81-89, 1996.

TAFURI, W.L.; MELO, M.N.; PAIVA, M.C.; MOSSER, D.M. Kinetics of an experimental inflammatory reaction induced by *Leishmania major* during the implantation of paraffin tablets in mice. *Virchows Arch*, v.437, n.4, p.429-35, 2000.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*, v.96, p.203-212, 2001.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; GONCALVES, R.; DE MELO, M. N.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*, v.292, n.1-2, Sep, p.17-23, 2004.

TAPIA, F. J.; CACERES-DITTMAR, G.; SANCHEZ, M. A. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today*, v.15, n.4, p.160-165, 1994.

TEIXEIRA, C. R.; TEIXEIRA, M. J.; GOMES, R. B. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol*, v.175, n.12, p.8346-53, 2005.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg*, v.52, n.3, Mar, p.287-92, 1995.

TRAVI, B.L.; TABARES, C.J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg*, v.64, p.119-124, 2001.

TURCO, S. J. e DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, v.46, p.65-94, 1992.

VIDOR, E.; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DUREUIL, N.; BISSUEL, G.; MOREAU, Y. ; RIOUX, J. A. Le chancre d'inoculation dans La leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. Etude d'une cohorte en region cévenole. *Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, v.26, p.133-7, 1991.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): a guide with abstracts of microplate applications. *Guernsey: Dynatech Europe*, p.124, 1979.

XAVIER, S. C.; DE ANDRADE, H. M.; MONTE, S. J. ; CHIARELLI, I. M. ; LIMA, W. G. ; MICHALICK, M. S. ; TAFURI, W. L. ; TAFURI, W. L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res*, v.2, p.17, 2006.

WARBURG, A. e SCHLEIN, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg*, v.35, n.5, Sep, p.926-30, 1986.

WEIGLE, K. e SARAIVA, N. G.. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*, v.14, n.5, Sep-Oct, p.433-50, 1996.

WILLIAMS, G.T. e WILLIAMS, W. Granulomatous inflammation: a review. *J. Clin Pathol*, v.36, p.723-733, 1983.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em <<http://www.who.int/leishmaniasis/en>>,2002.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>, 2006 acesso em abril de 2008.

Anexos

Anexo A

Protocolo A – Reação de imonofluorescência indireta (RIFI)

Os soros obtidos dos cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* foram submetidos à Reação de imonofluorescência indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos IgG segundo a técnica descrita por CAMARGO (1964), com as seguintes modificações: para a obtenção do título desejado, os soros a serem testados foram diluídos na razão de um para dois, a partir de 1:40, em PBS. Foram colocados 25µl da solução obtida sobre cada região demarcada de uma lâmina, na qual foi previamente fixado o antígeno, constituído por formas íntegras de promastigotas de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1967/BH46. Após a incubação das lâminas em câmara úmida, por 30 minutos em estufa a 37°C, essas foram lavadas com PBS, cobertas com o mesmo por cinco minutos, lavadas em água destilada e secas sob ventilação artificial (Ventilador Britânia B20, Brasil). Posteriormente, em cada região demarcada da lâmina foram acrescentados 25µl do conjugado, diluído a seu título, em azul de Evans (EVANS BLUE®, Sigma Aldrich, EUA) a 1/5000, sendo esse previamente preparado em PBS Tween (Tween® 80, Merck, Alemanha) a 2%. O conjugado utilizado (Bethyl Lab. Inc., EUA), marcado com Isotiocianato de Fluoresceína, foi específico anti-IgG de cão. Seguiram-se nova incubação, lavagem e secagem. A lâmina foi, então, coberta com glicerina tamponada e lamínula e a leitura procedida em microscópio de luz ultravioleta (Olympus BX 41®, Japão). Soros sabidamente positivos e negativos foram usados na mesma lâmina como controle da reação.

Soluções para realização da RIFI

- **Solução de Tampão Fosfato (PBS) pH 7,4**

Na ₂ HPO ₄ (Merck, Alemanha)	1,20g
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O (Merck, Alemanha)	0,22g

NaCl (Merck, Alemanha)	8,5g
H ₂ O destilada	q.s.p. 1000ml

- **Solução de Azul de Evans 1:100**

Azul de Evans (Sigma)	0,1g	0,05g	0,025g
H ₂ O destilada q.s.p.	10,0ml	5,0ml	2,5ml
Azul de Evans	50µl		
PBS - Tween 80 a 2%	2950µl		

- **Glicerina tamponada**

Glicerina P.A. (Merck)	75ml
Salina Tamponada (especial)	25ml

Salina Tamponada (especial)

Solução 1

0,1M Na₂HPO₄ · 7 H₂O 0,268g / ou · 2 H₂O 0,178g

Solução 2

0,1M NaH₂PO₄ x H₂O 0,138g

Em 10 ml de água destilada

Tomar 9,45ml da solução 1, adicionar 0,55ml da solução 2 dando um pH8,0.

Protocolo B – Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A detecção de anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania*, nos soros obtidos, foram realizados pelo método de ELISA de acordo com a técnica descrita por VOLLER et al. (1979), com modificações: Os antígenos utilizados foram produzidos a partir de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* cepa MHOM/BR/1967/BH46. Essas foram centrifugadas a 250g (Hermle Z 323K,

Alemanha), por dez minutos a 4°C, ressuspendidas em PBS e submetidas a ruptura por ultra-sonografia a 25ω por 45 segundos, cinco vezes (BRANSON 1510®, Branson Ultrasonics Co., EUA). A quantidade de proteína obtida foi dosada através do método de Lowry (LOWRY et al.,1951), sendo armazenada a -20°C em alíquotas até o momento do uso. Antes da implementação do ensaio imunoenzimático, nas amostras a serem testadas, realizou-se padronização do conjugado, uma vez que a concentração ideal de antígeno e diluição dos soros já estava padronizada. A diluição ótima do conjugado, anti-IgGT-cão obtido a partir de soro imune de coelho (Sigma/USA - A6792), foi obtida por titulação em bloco, a partir de um “pool” de soros de cães parasitologicamente positivos para LV e um “pool de soros de cães negativos, provenientes de área não endêmica para LV.” Os soros foram diluídos 1/400, dispostos em triplicatas e o conjugado submetido a sucessivas diluições, iniciando-se 1/200 e terminando 1/204800. A partir dos resultados absolutos das absorbâncias, a 492nm, das triplicatas de cada diluição do conjugado obteve-se a média. Para cada diluição, foi calculada uma razão entre os valores de absorbância dos soros positivos e dos soros negativos. Assim, o título ideal foi escolhido como sendo o valor mais elevado, ou seja, quando houvesse distinção mais fidedigna entre soro positivo e soro negativo.

Foram utilizadas microplacas de polietileno (Falcon®, BD Lab., USA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício das microplacas foi sensibilizado com 2μg do antígeno diluídos em 100μl de tampão carbonato, seguindo-se um período de 24 horas para permitir que o antígeno se adsorvesse às paredes de cada orifício. Após a sensibilização, o excesso de antígeno foi retirado através de lavagem da placa, por uma vez, com solução de lavagem. A solução para bloqueio de sítios inespecíficos foi adicionada, na ordem de 150μl por orifício, seguindo-se incubação por 30 minutos a 37°C. O excesso de solução tampão de bloqueio foi retirado por duas lavagens sucessivas. Os soros foram diluídos em tampão de incubação. Foi aplicado 100μl da solução diluída em cada orifício, sendo utilizada a diluição 1:400. Seguindo-se incubação por 45 minutos a 37°C e retirada do excesso do soro diluído por uma série de cinco lavagens. O conjugado foi diluído a seu título e 100μl dessa diluição foi acrescentada em cada orifício. Após nova incubação por 45 minutos a 37°C, o excesso de conjugado foi retirado por nova série de cinco lavagens. A solução do substrato foi então preparada e 100μl acrescentados em cada orifício. A reação ocorreu por 10 minutos a 37°C, quando

foi interrompida pela adição de 25µl de H₂SO₄ 4N (Merck, Alemanha) em cada orifício. Em qualquer etapa, após cada lavagem, as placas foram secas por inversão sobre papel absorvente. As leituras das reações foram realizadas em leitor de ELISA (BioRad. Modelo 550, Brasil) a 492nm. Os resultados expressos em valores de absorbância. Para cada placa o ponto de corte foi estabelecido a partir da média dos valores de absorbância dos soros dos cães de área não endêmica, adicionada de três vezes o desvio padrão. As soluções para a execução da técnica estão descritas a seguir:

- **Solução de Tampão Fosfato (PBS) pH 7,6**

Na ₂ HPO ₄ (Merck)	3,30g ou 4,136g x 2 H ₂ O
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Merck)	0,39g ou 0,3215g x 2 H ₂ O
NaCl (Merck)	21,25g (17g/2litros)
H ₂ O destilada	q.s.p. 2,5 litros

- **Tampão Carbonato (Coating Buffer)**

Na ₂ CO ₃ (Merck)	1,59g
NaHCO ₃ (Merck)	2,93g
H ₂ O destilada	q.s.p. 1 litro

Viável por 15 dias a 4°C.

- **Solução de Lavagem**

NaCl (Merck)	9g
Tween 20 (Merck)	0,5ml
H ₂ O destilada	q.s.p. 1 litro

Manter a 4°C

- **Tampão de Bloqueio**

PBS pH 7,6 1000ml

Caseína (Sigma, Alemanha) 20g

Aquecer o PBS a aproximadamente 90°C, adicionar a caseína lentamente, agitando com bastão. Filtrar. Conservar a -20°C.

- **Tampão de Incubação**

PBS pH 7,6 1000ml

Tween 20 0,5ml

Caseína (Sigma, Alemanha) 2,5g

Aquecer o PBS a aproximadamente 90°C, dissolver a caseína e colocar o Tween. Conservar a -20°C.

- **Tampão do Substrato ou Tampão do Ácido Cítrico**

Na_2HPO_4 7,19g ou 9,012g x 2 H_2O

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Ácido Cítrico) (Merck) 5,19g ou 5,7g x 2 H_2O

H_2O destilada 1 litro

- **Solução do Substrato**

Orto-phenyldamidina (Sigma® Aldrich, EUA) 10mg

H_2O_2 (30V) 4 μl

Tampão do Acido Cítrico 10ml

Preparar na hora do uso

- **H_2SO_4 4N**

H_2SO_4 concentrado (Merck) 480ml

H_2O q.s.p. 1000ml

Protocolo C - Hematoxilina e Eosina

Soluções:

Hematoxilina de Harris
Eosina
Xilol
Álcool 70, 80, 90 e 100%
Água corrente

Técnica:

As lâminas foram desparafinadas em xilol por 10 minutos. Em seguida foram hidratadas em soluções de álcoois decrescentes (100, 90, 80 e 70%) e lavadas em água corrente por cinco minutos. Logo após, foram coradas em hematoxilina por 50 segundos e novamente lavadas em água corrente por 20 minutos. Em seguida foram coradas pela eosina por um minuto e meio e então banhadas em água corrente, desidratadas em soluções de álcool crescente (70, 80, 90, 100%) e posteriormente diafanizadas em xilol e montadas com EntelamTM.

Protocolo D – Dominici

Soluções:

Solução de Fucsina-Laranja G:

Fucsina ácida	2g
Laranja G ou Eosina amarela (Y)	2g
Água destilada q.s.p.	400ml

Solução de Azul de Toluidina:

Azul de Toluidina	0,5g
Álcool 60 e 95°	20ml
Água destilada	80ml

Técnica:

As lâminas foram desparafinadas em xilol por 10 minutos. Em seguida foram hidratadas em soluções de álcoois decrescentes (100, 90, 80, 70%) e lavadas em água corrente por cinco minutos. Logo após, foram lavadas em água destilada e coradas pela Fucsina-Laranja G em rápido mergulho (20 segundos), lavadas rapidamente em álcool 60% e coradas pelo azul de toluidina em rápido

mergulho (20 segundos). Lavadas rapidamente em álcool 60% novamente. Foram então diferenciadas em álcool 95° até o corte se tornar vermelho. Em seguida foram desidratadas rapidamente em álcool absoluto e colocadas no xilol por cinco minutos e montadas com Entelam™.

Análise:

Azul: grânulos de mastócitos

Vermelho/ roxo: outros tecidos

Laranja brilhante: grânulos de eosinófilos

Lilás pálido: grânulos de neutrófilos.

Protocolo E - Imuno-histoquímica

A marcação de formas amastigotas de *Leishmania* foi realizada pela técnica da imuno-histoquímica (TAFURI et al, 2004), na pele.

Soluções:

Soluções de Peróxido de Hidrogênio: Duas soluções foram preparadas: uma para o bloqueio da peroxidase endógena composta de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 4% e outra para a revelação que consistia de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16%.

Solução Reveladora de Diaminobenzidina: A solução foi preparada com Diaminobenzidina (DAB) a 0,024%, acrescida da solução de peróxido de hidrogênio descrita anteriormente.

Solução Tampão Fosfato Salino (PBS – “Phosphate Buffer Saline” – pH 7,2, 0,01M): entre as etapas da técnica, essa solução foi utilizada para lavagem das lâminas com banhos consecutivos de cinco minutos cada.

Bloqueio de sítios inespecíficos: foi utilizada solução de leite desnatado a 6% diluído em PBS.

Anti-soro e Anticorpos monoclonais (anticorpo primário): para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* nos tecidos, utilizou-se um soro de cão naturalmente infectado na diluição de 1:100.

Anticorpo secundário: foi utilizado o anti-soro de cabra anti-camudongo e coelho biotilado da DAKO (LSAB 2 System, Peroxidase – K0675).

Peroxidase complexada em estrepto-avidina da DAKO (LSAB 2 System, Peroxidase – K0675).

Técnica:

Lâminas provenientes de blocos parafinados foram inicialmente desparafinadas em duas diferentes soluções de xilol por 15 minutos em cada;

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 4%, 30 minutos a temperatura ambiente.

Para o bloqueio das reações inespecíficas adicionou-se leite desnatado 6% e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente.

Para formas amastigotas foi utilizado como anticorpo primário o soro de cão naturalmente infectado na diluição de 1:100 em quantidade suficiente para cobrir os fragmentos. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C.

Adição do anticorpo secundário e incubação em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente.

Emprego da estreptoavidina-peroxidase e incubação por 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente.

Revelação da peroxidase com a solução reveladora com peróxido de hidrogênio por cinco minutos a temperatura ambiente.

Lavagem das lâminas em água corrente e contra-coloração com hematoxilina de Harris por três segundos.

Banho de 10 minutos em água corrente.

Desidratação nos álcoois crescentes (70% ao absoluto), diafanização em xilol e montagem com bálsamo Entelam™.

Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. O controle negativo foi feito utilizando PBS, no lugar de soro de cão infectado, na diluição de 10%. O controle positivo foi feito utilizando-se uma lâmina com corte histológico de órgãos de cães naturalmente infectados com alto parasitismo.

Protocolo F – Good Pasture

O método de coloração para a visualização de bactérias no tecido foi iniciado com a desparafinização das lâminas. Em seguida essas foram coradas pela fucsina fenicada – anilina por dez minutos, lavadas em água destilada por três minutos, tratadas pelo aldeído fórmico por três minutos e então lavadas e, água destilada por cinco minutos. As lâminas em seguida tratadas com ácido pícrico por cinco minutos e lavadas em água corrente por três minutos. Foram tratadas pelo álcool 95% até que ele ficou totalmente transparente (sem corante). Em seguida foram lavadas em água corrente por três minutos. As lâminas foram coradas pelo violeta cristal-anilina corrente por três minutos e lavadas pelo lugol por um minuto e depois lavadas em água corrente por três minutos, desidratadas em álcool e montadas em bálsamo.

Corantes e Soluções:

Fucsina básica fenicada-anilina

Fucsina	0,59g
Fenol	1ml
Óleo de anilina	1ml
Álcool 30%	100ml

Lugol

Iodeto sublimado	1g
Iodeto de potássio	2g
Água destilada	100ml

Violeta cristal-anilina

Violeta cristal sol. aq. 2%	27ml
Junte 3ml da solução:	
Álcool absoluto	33ml
Óleo de anilina	9ml

Violeta cristal para saturação

Ácido pícrico sol. aq. saturada

Dissolva a quente 1 a 1,5g de ácido pícrico e

100ml de água destilada. Deixe esfriar e filtre no dia seguinte

Resultados:

Azul: bactérias Gram-positivas

Vermelho: bactérias Gram-negativas

Púrpura-vermelho: outros elementos

Protocolo G - Gelatina Especial

Para o preparo dessas lâminas, elas devem estar limpas. Enquanto se prepara a solução de gelatina, deixe-as em água destilada. Preparo da solução: aquecer a água destilada e acrescentar a gelatina deixando-a dissolver. Uma sugestão é usar o agitador magnético com aquecimento. Adicionar o alúmen crômico, obtendo uma solução verde-azulada. Filtrar a solução ainda morna, retirar as lâminas da água destilada, deixando-as na solução de gelatina por 30 minutos. Escorrer bem e secar por 24 horas, cobertas. Após esse período, as lâminas estão prontas para serem usadas ou guardadas.

Solução:

Gelatina	10g
Sulfato de cromo III de potássio (Alúmen crômico)	1g
Água destilada aquecida	2000ml

Protocolo H - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A extração do DNA das amostras dos fragmentos de pele incluídos em parafina foi realizada utilizando o “DNA ISOLATION KIT ®” (Gentra, EUA) seguindo instruções do fabricante com algumas modificações. Os fragmentos foram cortados em capela de fluxo laminar 72 previamente descontaminada pela ação da luz ultravioleta, com auxílio de uma lâmina de barbear inoxidável estéril – uma lâmina para cada bloco de parafina. Com um dos lados da lâmina foram retirados e descartados fragmentos da superfície do bloco a fim de evitar

contaminações. Com o outro lado cortante da lâmina foram retirados fragmentos do material a ser utilizado para extração. Após a remoção do excesso de parafina com auxílio da lâmina de barbear, cerca de 10mg de tecido foram colocados em tubo de microcentrífuga de 1,5ml, onde foram triturados com pistilos de polietileno estéreis (Cienceware®, Bel-Art Products, EUA) moldados para os tubos. Os fragmentos triturados foram desparafinados com adição de 300µl de xilol (Merck, Alemanha) em cada tubo. As amostras foram então homogeneizadas por cinco minutos à temperatura ambiente, em movimentos constantes com auxílio de um homogeneizador automático (Lab Rotator®, Ames Co.,EUA). A seguir as amostras foram centrifugadas a 13.000g por três minutos, para descarte do xilol. Esse processo foi repetido por mais duas vezes, totalizando três banhos com xilol. As amostras foram submetidas a mais duas lavagens com 300µl de etanol 100% (Merck, Alemanha), em movimentos constantes, por cinco minutos. Seguiram-se centrifugação, a 13.000g por três minutos e descarte do etanol. Foi adicionado 300µl de solução de lise celular (DNA Isolation Kit®) em cada tubo com as amostras desparafinadas. Nessa etapa foram utilizados os pistilos para comprimir e homogeneizar os fragmentos no fundo do tubo fazendo-se 50 movimentos circulares, no sentido horário. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos, tratadas com adição de 1,5µl proteinase K (15mg/ml) (Sigma Aldrich, EUA) e homogeneizadas por inversão dos tubos. A seguir, foram incubadas a 55°C durante a noite e tratadas com 1,5µl RNase (4mg/ml) (Sigma Aldrich, EUA). Após a adição da RNase, os tubos foram homogeneizados por inversão e incubadas a 37°C por uma hora. À temperatura ambiente, as amostras foram tratadas com 100µl solução de precipitação de proteína (Kit DNA Puregene®). As amostras foram submetidas à homogeneização com auxílio de um aparelho vórtex para agitação (Certomat® MV, B. Braun, Alemanha) por 20 segundos e centrifugação a 13.000g por três minutos. Em seguida o sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml contendo 300µl de isopropanol (Merck, Alemanha), homogeneizado cuidadosamente por inversão do tubo; centrifugado a 13.000g por cinco minutos; descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 300µl de etanol 70% (Merck, Alemanha) e centrifugou-se a 13.000g por um minuto, descartando cuidadosamente o sobrenadante. Após a secagem completa do tubo a temperatura ambiente, foi

adicionado ao DNA extraído 20µl de solução de hidratação (Kit DNA Puregene®), sendo em seguida estocado a 4°C.

A amplificação do DNA através da PCR específica, o desenho dos iniciadores da reação bem como o protocolo da PCR foram realizados como descrito a seguir: A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (PTC-100®, M.J. Research Inc., EUA), utilizando-se o par de iniciadores LV1 e LV2 específicos para o complexo donovani (INVITROGEN BRAZIL, Brasil).

Iniciador	Sequência	Número de Nucleotídeos
LV1	5' ACGAGGTCAGCTCCACTCC 3'	19
LV2	5' CTGCAACGCCTGTGTCTACG 3'	20

Para a amplificação, 15pmol de DNA foi adicionado a uma mistura contendo 15pmol de iniciador LV1; 15pmol de iniciador LV2; 7µl de “Go Taq® Green Master Mix”; 3,5µl de H₂O deionizada “nuclease free” (Kit Go Taq® Green Master Mix, Promega, EUA). Em todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos. Os controles da reação para o material da biopsia de pele de orelha foram: DNA extraído de material de fragmento de pele de orelha embocado em parafina de cão sabidamente portador de LV, DNA extraído de fragmento de pele de orelha embocado em parafina de cão negativo para a doença. Para a reação, foram adicionados 1ng de DNA de *L.chagasi*, cepa MOHM/BR/1967/BH46, obtida em meio de cultura e um controle com todos os reagentes utilizados na reação exceto o DNA. A amplificação foi realizada a partir de um passo inicial de desnaturação por cinco minutos a 95°C; anelamento por 30 segundos a 59°C (ligação dos iniciadores); extensão a 72°C por trinta segundos e desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguidos por 33 ciclos iguais; a extensão final ocorreu a 72°C por dois minutos. Os componentes da reação estão representados no quadro abaixo.

Componentes	Quantidade
“Go Taq® Green Master Mix”*	7µl
Iniciadores LV1 e LV2	1,5µl de cada – 10pmol/µl
DNA extraído	1,5µl
H2O “nuclease free”* q.s.p.	15µl

* Kit Go Taq® Green Master Mix (Promega, EUA)

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (Sigma Aldrich, EUA) não desnaturante em TBE (89mM TRIS-BORATO, 2mM EDTA, pH 8,0) por aproximadamente duas horas ou até que o corante xileno-cianol utilizado no marcador de peso molecular tivesse percorrido dois centímetros. Foi utilizado como marcador de peso molecular de 100pb (Promega, EUA). Foram aplicados 4µl do produto amplificado por canaleta, que foram submetidos a uma tensão de 120 volts. Após a eletroforese, os fragmentos amplificados, foram visualizados por coloração pelo nitrato de prata (Synth, Brasil) segundo técnica descrita por SANTOS et al. (1993), com modificações. O gel foi fixado à temperatura ambiente por cinco minutos em solução contendo 10% de etanol absoluto (v/v) (Merck, Alemanha) e 0,5% de ácido acético (v/v) (Merck, Alemanha), seguida de incubação por 5 minutos em 150ml de solução contendo 0,7% de nitrato de prata (p/v) (Synth, Brasil), e de nova incubação com uma solução reveladora contendo 3% de NaOH (p/v) (Merck, Alemanha) e 0,1% de formaldeído 37% (v/v) (Merck, Alemanha), por 10 minutos ou até o aparecimento das bandas, sempre sob agitação suave (Orbit Shaker ®, Lab-Line, EUA). Posteriormente o gel foi transferido para a solução fixadora e documentado por fotografia para análise. A contaminação da reação por amplicons foi evitada pelo uso de diferentes ambientes para o processamento das amostras, além dos processos rotineiros de descontaminação das áreas de trabalho.

Anexo B

Protocolo CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 190/2006**, relativo ao projeto intitulado "*Análise histológica e morfométrica da inflamação crônica de pele de cães natural e experimentalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi*", que tem como responsável **Wagner Luiz Tafuri**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **4/04/2007**.

Este certificado expira-se em **4/04/2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 190/2006**, related to the project entitled "*Histological and morphometrical analyses of the chronic inflammatory reaction of skin biopsies of dogs naturally and experimentally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi*", under the supervision of **Wagner Luiz Tafuri**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 4, 2007**.

This certificate expires in **April 4, 2012**.

Belo Horizonte, 11 de Abril de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)