

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Ramon de Alencar Pereira

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) NATURAL E EXPERIMENTAL
COMO DOENÇA FIBROSANTE**

Belo Horizonte - MG

2021

Ramon de Alencar Pereira

**LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) NATURAL E EXPERIMENTAL
COMO DOENÇA FIBROSANTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Investigativa

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri

Coorientadora: Profa. Dra. Izabela Ferreira Gontijo de Amorim

Belo Horizonte - MG

2021

- 043 Pereira, Ramon de Alencar.
 Leishmaniose Visceral Canina (LVC) natural e experimental como doença
 fibrosante [manuscrito] / Ramon de Alencar Pereira. - 2021.
 80 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri. Coorientadora: Profa. Dra. Izabela
 Ferreira Gontijo de Amorim.
- Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
 Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.
1. Patologia. 2. Fibrose. 3. Leishmaniose Visceral. 4. Fígado. 5. Pulmão. 6. Rim.
 I. Tafuri, Wagner Luiz. II. Amorim, Izabela Ferreira Gontijo de. III. Universidade
 Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DE DEFESA DE DOUTORADO Nº 438 DE RAMON DE ALENCAR PEREIRA

Realizou-se, no dia 20 de dezembro de 2021, às 14 horas, por videoconferência, plataforma online, a defesa de Tese, intitulada "**Leishmaniose Visceral Canina (LVC) Natural e Experimental como Doença Fibrosante**", apresentada por **Ramon de Alencar Pereira**, número de registro **2017695577**, graduado no curso de **Ciências Biológicas**, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em **PATOLOGIA**, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurentti** – FM/USP; **Profa. Dra. Claudia Martins Carneiro** – UFOP/MG; **Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal** – FM/UFMG; **Profa. Dra. Amanda Maria Sena Reis** – ICB/UFMG; **Profa. Dra. Izabela Ferreira Gontijo de Amorim** – FAMINAS-BH/MG e Núcleo de Ensino e Pesquisa do Instituto Mário Penna – **COORIENTADORA**; **Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri** – ICB/UFMG – **ORIENTADOR**.

A Comissão considerou a Tese:

Aprovado

Reprovado

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2021.

*** De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a Secretaria do Programa em Patologia da UFMG emitirá Certificado de Conclusão do Doutorado.**



Documento assinado eletronicamente por **Wagner Luiz Tafuri, Professor do Magistério Superior**, em 22/12/2021, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Maria Sena Reis, Professora do Magistério Superior**, em 22/12/2021, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Martins Carneiro, Usuário Externo**, em 23/12/2021, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Izabela Ferreira Gontijo de Amorim, Usuário Externo**, em 23/12/2021, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Marcia Dalastra Laurenti, Usuário Externo**, em 23/12/2021, às 11:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº](#)



[10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Paula Vieira Teixeira Vidigal, Secretário(a)**, em 23/12/2021, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1158484** e o código CRC **2DEE71B1**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e à minha família que foram os alicerces de toda a minha trajetória até aqui. Ao Professor Doutor Wagner Tafuri por ter me dado essa grande, desafiadora e gratificante oportunidade de aprendizado. À minha coorientadora Professora Doutora Izabela Ferreira Gontijo de Amorim também pelo aprendizado, mas por tanto afeto, dedicação e amizade ao longo de todos esses anos. Ao meu amigo Professor Doutor Adriano Francisco Alves, você foi essencial para que esse trabalho fosse realizado, obrigado pelos bons momentos ao longo de todos esses anos.

Ao Igor Campos e Gabriela Alves muito obrigado por toda a dedicação que tiveram durante a iniciação científica, este trabalho só foi possível devido a ajuda de vocês. Agradeço às técnicas do Departamento de Patologia da UFMG por nos fornecer os meios para que este estudo fosse conduzido corretamente.

A todos os professores do Departamento de Patologia que contribuíram diretamente e indiretamente na minha formação.

À equipe do Núcleo de Ensino e Pesquisa do Instituto Mario Penna pela acolhida nessa reta final do doutorado, pela compreensão e pelo reconhecimento do meu trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi confirmar a leishmaniose visceral canina (LVC) como uma doença fibrosante de caráter sistêmica. Para isso, foi realizado um estudo imunohistoquímico e quantitativo molecular dos tecidos do fígado, pulmão e rim caninos. Utilizamos dois grupos experimentais consistindo de cinco beagles adultos experimentalmente infectados com *L. infantum* cepa MCAN BR / 2002 / BH401 e outros cinco beagles adultos infectados com a cepa MCAN / BR / 2000 / BH400; um grupo de controle positivo consistindo de vinte cães adultos sem raça definida naturalmente infectados com *L. infantum* e um grupo de controle negativo compreendendo quatro beagles adultos negativos para infecção com *L. infantum*. A deposição de colágeno (fibropoiese) foi detectada e quantificada pela coloração de prata amoniacal de Gomori, onde detecta fibras reticulares em preto. Os cães do grupo BH401 e do grupo positivo apresentaram fibropoiese intensa no fígado, pulmões e rins, sempre associada a hepatite crônica, pneumonite crônica intersticial e glomerulonefrite, respectivamente. Marcadores para miofibroblastos (marcadores mesenquimais) alfa-actina (α -SMA) e vimentina foram identificados por imunohistoquímica. O fator de transformação de crescimento da citocina beta (TGF- β) foi identificado por imunohistoquímica e ensaios moleculares. A expressão dos marcadores α -SMA, vimentina e TGF- β 1, bem como a expressão do gene TGF- β 1, associada a altos níveis de deposição de colágeno, foi maior no grupo BH401, seguido pelo grupo controle positivo. Concluímos que o processo de fibrose ocorre de forma simultânea no fígado, pulmões e rins de cães naturalmente e experimentalmente infectados e a cepa MCAN BR / 2002 / BH401 de *L. infantum* seria uma boa escolha para estudo dos mecanismos da fibrose no cão associada às alterações histológicas clássicas da LVC

Palavras-chave: Fibrose, leishmaniose visceral canina, fígado, pulmão, rim.

ABSTRACT

The aim of this work was to confirm canine visceral leishmaniasis (CVL) as a systemic fibrotic disease. For this, an immunohistochemical and molecular quantitative study of canine liver, lungs, and kidneys tissues were carried as follow: two experimental groups consisting of five adult beagles experimentally infected with *L. infantum* strain MCAN BR/2002/BH401 and other five adult beagles infected with the strain MCAN/BR/2000/BH400; a positive control group consisting of twenty adult mixed breed dogs naturally infected with *L. infantum*, and a negative control group comprising four adult beagles negative for infection with *L. infantum*. Collagen deposition (fibropoiesis) was detected and quantified by Gomori ammoniacal silver's staining where it detects reticular fibers in black. Dogs of BH401 group and the positive group showed a conspicuous and intense fibropoiesis in liver, lungs and kidneys always associated to a chronic hepatitis, interstitial chronic pneumonitis, and glomerulonephritis, respectively. Markers for myofibroblasts (mesenchymal markers) alpha-actin (α -SMA) and vimentin were identified by immunohistochemistry. The cytokine transforming growth factor beta (TGF- β) was identified by immunohistochemistry and molecular assays. The expression of α -SMA, vimentin, and TGF- β 1 markers, as well as gene expression of TGF- β 1, associated with high levels of collagen deposition was highest in the BH401 group, followed by the positive control group. We conclude that the fibrosis process occurs simultaneously in the liver, lungs and kidneys of naturally and experimentally infected dogs and that the MCAN BR / 2002 / BH401 strain of *L. infantum* would be a good choice for studying the mechanisms of fibrosis in dogs associated with the classic histological changes of CVL

Keywords: Fibrosis, canine visceral leishmaniasis, liver, lung, kidney.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CR3	Receptor do Tipo 3 do Complemento
DAB	Diaminobenzidina peroxidase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FN	Fibronectina
GCM	Glomerulonefrite Crônica do Tipo Membranoproliferativa
HE	Hematoxilina-Eosina
HPRT	Hipoxantina Fosforibosiltransferase
HSC	Células Hepáticas Estreladas
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-γ	Interferon Gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
IgM	Imunoglobulina M
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina dois
IL-4	Interleucina quatro
IL-5	Interleucina cinco
IL-6	Interleucina seis
IL-8	Interleucina oito
IL-10	Interleucina dez
IL-12	Interleucina doze
IL-13	Interleucina treze
L1	Proteína Calprotectina
LN	Laminina

LPG	Lipofosfoglicanos
LPS	Lipopolissacarídeo
LTBP	Proteína Ligante de Fator de Crescimento de transformação latente
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral humana
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
Mrna	Ácido Ribonucleico Mensageiro
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Reação de Cadeia em Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
RT PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
TGF-β1	Fator de Crescimento Transformador Beta 1
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
α-SMA	Molécula Alfa-Actina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	27
Tabela 2	31
Tabela 3	32
Tabela 4	33
Tabela 5	33
Tabela 6	34
Tabela 7	34
Tabela 8	35
Tabela 9	35
Tabela 10	35
Tabela 11	36
Tabela 12	36
Tabela 13	36
Tabela 14	37
Tabela 15	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	29
Figura 2	37
Figura 3	41
Figura 4	43
Figura 5	45
Figura 6	47
Figura 7	49
Figura 8	51
Figura 9	55
Figura 10	57
Figura 11	58
Figura 12	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.....	38
Gráfico 2	39
Gráfico 3	40
Gráfico 4	42
Gráfico 5	44
Gráfico 6	46
Gráfico 7	48
Gráfico 8.....	50
Gráfico 9	52
Gráfico 10.....	53
Gráfico 11.....	54
Gráfico 12.....	54

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. A leishmaniose visceral e a fibrose.....	18
3. Polarização dos macrófagos e a fibrose.....	19
4. O cão experimentalmente infectado como modelo de estudo da leishmaniose visceral.....	19
5. Justificativa.....	22
6. Objetivos.....	23
6.1 Objetivo Geral	23
6.2 Objetivos Específicos.....	23
7. Material e Métodos.....	24
7.1 Amostras e randomização das amostras em grupos.....	24
7.2 Protocolo cães experimentalmente infectados.....	25
7.3 Histologia.....	25
7.4 Análise das fibras colágenas.....	26
7.5 Análise imunohistoquímica da expressão de A-SMA, vimentina, de CD163, calprotectina (L1) e TGF β 1 (TGF-B1).....	26
7.6 Técnica da estreptavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas de <i>leishmania</i> nos fragmentos de fígado, pulmões e rins parafinados	28
7.7 Morfometria digital.....	29
7.7.1 Técnica de morfometria	29
7.7.2 Análise estatística individual do colágeno III, α -SMA, vimentina e TGF- β 1.....	29
7.8 Isolamento do RNA e síntese do DNA complementar	30
7.9 PCR em tempo real.....	31
7.10 Análise estatística da expressão gênica	31
8. Resultados.....	32
8.1 Análise histopatológica do fígado de cães experimentalmente e naturalmente (controle positivo) infectados	32
8.2 Análise histopatológica do pulmão de cães naturalmente e experimentalmente infectados.....	34
8.3 Análise histopatológica do rim de cães naturalmente e experimentalmente infectados.....	35
8.4 Análise da carga parasitária pela técnica de imunohistoquímica	38

8.5 Análise da expressão de Calprotectina (L1) e CD163 no fígado, pulmão e rim de cães experimentalmente e naturalmente infectados.....	41
8.6 Análise do fator de crescimento tumoral beta 1 (TGF- β 1) no fígado, pulmões e rins de cães naturalmente e experimentalmente infectados.....	53
8.7 Análise de α -actina de músculo liso (α -SMA), vimentina, no fígado, pulmão e rim de cães experimentalmente e naturalmente infectados.....	56
8.8 Análise de fibras reticulares (colágeno tipo III) no fígado de cães naturalmente e experimentalmente infectados.....	59
09. Discussão.....	61
10. Conclusão.....	67
11. Referências Bibliográficas.....	68

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral humana (LVH) é uma doença sistêmica e fatal se não tratada. A LVH faz parte de um grupo de doenças consideradas negligenciadas e que nas Américas foram descritas em doze países tendo como agente etiológico o protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*. No Brasil 3.500 casos são registrados anualmente (Brasil, Ministério da Saúde, 2018) e o cão (*Canis lupus familiaris*) é o reservatório doméstico da doença atuando para a manutenção do ciclo biológico do parasito. A participação desses animais no ciclo de transmissão da LVH foi reconhecida desde a década de 50 no Nordeste brasileiro por Deane & Deane (1962). Os autores, em estudo comparativo entre a infecção canina e humana, demonstraram a presença do parasito em 16,3% da pele dos indivíduos e em 77,6% dos cães naturalmente infectados. Além disso, verificou-se que a infecção experimental de flebotomíneos era mais frequente e intensa quando os insetos se alimentavam nos cães infectados (75%) do que em humanos (28,5%).

No Brasil, os casos de LVH e a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) encontram-se distribuídas em Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraíba, Piauí, Pernambuco, Roraima, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte e Sergipe (Lainson & Rangel, 2005). Já na região Sul, os primeiros casos de LVC foram registrados em 2008 em São Borja, RS. Também, na mesma cidade, ocorreram os primeiros casos em humanos em 2009 (Brasil, Ministério da Saúde, 2010). O estado de Santa Catarina era considerado indene para LV, entretanto, Figueiredo e colaboradores (2012) descreveram os primeiros casos autóctones de LVC na cidade de Florianópolis.

Na LVC ocorre uma extensa distribuição do parasito nos órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como a pele, medula óssea, fígado, rins, pulmão, órgãos linfoides, trato gênito-urinário e digestivo (Marzochi et al., 1985; Tafuri et al., 1989; Alvar et al., 2004; Xavier et al., 2006; Gonçalves et al., 2003; Madeira et al., 2016; Mendes et al., 2011; Pinto et al., 2011; Pinto et al., 2013; Figueiredo et al., 2013). Assim, a presença de parasitos em diferentes órgãos confere lesões e sinais clínicos característicos da LVC, Os animais acometidos podem ser classificados, de acordo com a sintomatologia em sintomáticos ou em assintomáticos (Mancianti et al., 1988; Alvar et al., 2004), de acordo com o tempo de evolução da doença nas fases aguda, subaguda e crônica ou latente regressiva (Pastorino et al., 2002; Alvar et al., 2004). As manifestações clínicas nas fases mais avançadas da LVC

incluem febre, perda progressiva de peso, anemia, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas (onicogrifose, alopecia, hiperqueratose, seborreia), icterícia, e insuficiência renal (Silva et al., 2018); sendo que nesse contexto se destaca o quadro de linfadenopatia, com acometimento dos linfonodos poplíteos, pré-escapulares e submandibulares, os quais apresentam uma consistente hiperplasia e hipertrofia, com evidente aumento do seu tamanho e de sua consistência, facilitando assim sua identificação quando do exame físico (Abranches et al., 1991; Alvar et al., 2004). Observa-se também apatia, ceratoconjuntivite, diarreia, vômito, edema de pata, caquexia e podendo levar ao óbito do animal na fase final da infecção (Deane e Deane, 1955; Da Silva et al., 2012).

Na LVC a distribuição dos parasitos é extensa resultando em diversas alterações nos órgãos acometidos. No fígado, microscopicamente são relatados hipertrofia e hiperplasia das células de Küpffer, infiltrado inflamatório granulomatoso preferencialmente localizado no interior dos lóbulos (granulomas intralobulares), espaço-porta e no entorno das veias centrolobulares (Tafuri et al., 1996), fibrose intralobular (Melo et al., 2008; Melo et al., 2009; Madeira et al., 2016, Castro et al., 2018) e hemocromatose (Nascimento et al., 2012). No pulmão, são relatados espessamento dos septos interalveolares causados por infiltrado de células mononucleares, tais como macrófagos, plasmócitos e linfócitos acompanhados de aumento da fibrilopose. Diferentemente de outros órgãos o pulmão é um órgão pouco parasitado por *leishmania* (Gonçalves et al., 2003).

As glomerulonefrites são frequentemente descritas na leishmaniose visceral canina, classificadas em glomerulonefrite membranoproliferativa ou glomerulonefrite mesangioproliferativa, caracterizada pela proliferação celular e aumento da matriz. Glomeruloesclerose segmentar e focal, caracterizada pela expansão segmentar da matriz mesangial, glomerulonefrite crescente caracterizada por acúmulo de células no espaço de Bowman, nefropatia membranosa caracterizada pelo espessamento da parede capilar glomerular (Alves et al., 2019).

2. A LEISHMANIOSE VISCERAL E A FIBROSE

Vários autores, pertencentes ao nosso grupo de pesquisa, vêm descrevendo, em animais com Leishmaniose Visceral Canina (LVC), a deposição colagenogênica em diversos órgãos, tais como: baço (Tafuri et al., 1996; Tafuri et al., 2001, Silva et al., 2013), fígado (Melo et al., 2008, Melo et al., 2009; Silva et al., 2013), rins (Tafuri et al., 2001, Silva et al., 2013), linfonodos (Silva et al., 2013) e pulmão (Silva et al., 2013). Melo e colaboradores (2009) avaliando a deposição de fibronectina (FN) e laminina (LN), proteínas de adesão celular, e colágeno (fibras reticulares) em cães com LV, os autores observaram que houve maior deposição de fibronectina e colágeno nos animais sintomáticos quando comparado aos grupos assintomáticos e controle não infectado; ao passo que, a deposição de laminina foi estatisticamente superior nos cães infectados (independente dos sinais clínicos) quando comparado ao grupo controle. Silva e colaboradores (2013) descreveram a notável deposição colagenogênica no fígado, pulmões e rins de animais sintomáticos infectados com *L. infantum* quando comparados aos animais controle (cães com exames sorológico e parasitológico negativos para *L. infantum*) todos obtidos de centros de zoonoses da região metropolitana de Belo Horizonte, MG.

Souza e colaboradores (2014) dando continuidade a esses achados correlacionaram o desbalanço sorológico e tecidual dos elementos traço em cães naturalmente infectados. Os autores discutem a fibrose com a intensa deposição desses elementos nos tecidos, em especial o ferro. Já Madeira e colaboradores (2016) avaliaram a expressão do fator de crescimento tumoral beta (TGF- β 1) elucidando alguns mecanismos dessa fibrose hepática evidenciada, então, na leishmaniose visceral canina, demonstrado por imunohistoquímica paralelamente a molécula alfa-actina (α -SMA), vimentina e citoqueratina como marcadores de ativação das células estreladas hepáticas (HSC) produtoras de colágeno. Castro e colaboradores (2018) estudando o fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* com antimonialto de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol observaram a diminuição das fibras de colágeno III e da expressão de α -SMA e vimentina em cães tratados com alopurinol.

Outro mecanismo descrito em processos fibróticos no fígado, rim e pulmão é o da transição epitélio mesênquima que é capaz de aumentar a fibrogênese nos tecidos através da diferenciação de células de origem epitelial em fibroblastos e miofibroblastos células

incriminadas como produtoras dos componentes da MEC que tem sua deposição aumentada durante o processo de fibrose (Aresu et al., 2007; Zeisberg et al., 2007; Fischer et al., 2015). Monócitos e macrófagos também são apontados como origem de miofibroblastos ao migrarem para o tecido e se diferenciarem (Keeley et al., 2010; Mosser & Edwards, 2008). A fibrose pode ser definida como excesso de deposição de componentes da matriz extracelular, sobretudo do colágeno (fibropoiese), sendo uma resposta fisiopatológica comum de muitos tecidos e órgãos submetidos à injúria (Wynn et al., 2008). A fibrose tem sido estreitamente relacionada com a presença de linfócitos (LT) CD4 com um perfil de produção de citocinas do tipo Th2, tais como: interleucina (IL)-4, IL-5, IL-13 e IL-21 e TGF β -1 (Song et al., 2000; Wynn et al., 2004). Paralelamente, macrófagos, denominados (M2c) expressando receptores CD163 (receptores scavengers de classe B) reativados alternativamente na presença de IL-4 e IL-13, carregam um programa funcional pró-reparo relacionados a fibrose (resolução da inflamação) e a homeostase tecidual (Mosser et al., 2008).

O excesso de acúmulo de MEC, que leva à fibrose, ocorre quando a formação excede a degradação (Wynn et al., 2004). As metaloproteinases de matriz (MMPs), especialmente 2 e 9, produzidas pelos macrófagos (principalmente nas inflamações crônicas), estão associadas ao processo de remodelamento tecidual sendo responsáveis pela degradação da MEC. Estudos avaliando a ação das metaloproteinases nas leishmanioses têm sugerido uma ação pleiotrópica das metaloproteinases, favorecendo o reparo tecidual, mas também causando sua destruição e progressão das lesões no fígado, pele e baço quando expressadas em excesso (Xue et al., 2006; Costa et al., 2008, Melo et al., 2009; Melo et al., 2011). Há relatos de sua expressão em infecções por protozoários do gênero *Leishmania* (Geurts et al., 2012).

3. POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS E A FIBROSE

A transmissão da leishmaniose envolve mecanismos complexos de interações entre os hospedeiros vertebrados, os vetores invertebrados e o parasito (Dantas-Torres et al., 2006). O ciclo inicia-se com a inoculação das formas infectantes do parasito, chamadas formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania*, durante o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas no hospedeiro vertebrado (Akhoundi et al., 2016). A expressão de determinantes de virulência como os lipofosfoglicanos (LPG), presente na superfície do parasito, conferem ao mesmo tanto uma resistência frente ao processo digestivo, no intestino médio do inseto vetor, quanto à ação lítica do complemento quando inoculado na derme do hospedeiro (killick-kendrick, 1990; Alexander et al., 1999). Assim quando da inoculação, por meio de receptores presentes

na superfície dos macrófagos, tais como o receptor do tipo 3 do complemento (CR3), o processo de internalização/fagocitose é potencializado facilitado quando essas formas promastigotas encontram-se opsonizadas com a fração C3bi do complemento (Mosser & Edelson, 1985). Após a fagocitose pelos macrófagos, na fase inicial da infecção, esses macrófagos tornam-se ativados com produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), por exemplo. Todavia, mesmo após esse estresse oxidativo, os parasitos sobrevivem e se diferenciam da forma móvel flagelada promastigota para a forma imóvel não flagelada em amastigota (Pearson et al., 1983, Besteiro et al., 2006; Biswas et al., 2011).

Essa diferenciação morfológica é resultado do aumento dos níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) que conduz a passagem para a fase G1 do ciclo celular e eleva a produção de enzimas antioxidantes (Bhattacharya et al., 2012). No hospedeiro vertebrado, a presença de uma resposta Th1 ou Th2, com perfis diferentes de citocinas e, conseqüentemente, diferentes estímulos sobre as células dos sistemas fagocítico mononuclear (SFM) contribui para uma susceptibilidade ou resistência a infecção (Kane & Mosser, 2001).

Sendo que na resposta TH1 frente a infecção por *L. infantum* os macrófagos são ativados por IFN- γ e TNF- α levando a morte das formas amastigotas de *Leishmania*. Macrófagos expressando a proteína Calprotectina (L1) está relacionada a uma ação microbicida e conseqüentemente ativada pela resposta TH1, enquanto que macrófagos ativados alternativamente por citocinas como IL-6, IL-10 e IL-4, expressando a glicoproteína CD163 está relacionado tanto a uma suscetibilidade à LVC quanto ao processo de fibrose (Buechler et al., 2000).

4. O CÃO EXPERIMENTALMENTE INFECTADO COMO MODELO DE ESTUDO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Existem diversos trabalhos publicados (protocolos) para o desenvolvimento da LVC experimental, mas há poucas informações disponíveis acerca dos aspectos anatomopatológicos. Mansour & McConnell (1973) avaliando a curva de crescimento parasitológica assim como o padrão de infecção no fígado e no baço de cães experimentalmente infectados com três cepas diferentes de *L. donovani* provenientes do Sudão, Mediterrâneo e do Quênia, concluíram que o cão é um reservatório eficiente da cepa que ocorre no Mediterrâneo.

Keenan e colaboradores (1984) avaliando a infecção experimental de dois grupos composto por três pastores alemães infectados com formas amastigotas de *L. infantum* e *L. donovani* durante 82 dias, observaram que os cães desenvolveram infecção persistente, emagrecimento, esplenomegalia e linfadenomegalia 55 dias após a inoculação. Todos os cães desenvolveram anemia normocítica e normocrômica, além disto, trombocitopenia e leucopenia foram relatadas. Os níveis de triptofano no sangue diminuíram consideravelmente. Hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia foram presentes em todos os cães. Os autores concluíram que cães da raça pastor alemão são bons modelos para o estudo laboratorial da LV. Trinta e cinco cães de raça beagle foram por inoculados por Costa e colaboradores (2013) via intradérmica com inóculo de 10^7 da cepa MCAN/BR/00/BA262 de *L. infantum* e saliva de *Lutzomyia longipalpis*. Os sinais observados pelos autores foram onicogrifose e linfadenopatia em 78,6 % dos cães, 50% apresentaram mudanças na pele e 14 % apresentaram esplenomegalia. Outro estudo comparando vias de inoculação intradérmica e intravenosa em beagles experimentalmente infectados com *L. infantum* na presença e na ausência de saliva concluiu que a via intradérmica de inoculação produz a forma assintomática da doença, além disso falhou em mostrar a eficácia da saliva de *L. longipalpis* como um agente intensificador da infecção experimental da leishmaniose canina (Paranhos-Silva et al., 2003) .

Nos estudos de Santos-Gomes e colaboradores (2002) as citocinas interferon-gama (IFN- γ), Interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12), IL-10 e IL-6 expressas por células mononucleares de sangue periférico de 13 cães de raça Beagle inoculados com formas amastigotas de *L. infantum* foram analisados durante 23 meses. Os cães desenvolveram alterações hematológicas, resposta imune humoral e redução da resposta específica linfoproliferativa. A presença de carga parasitária baixa foi detectada na pele, linfonodos poplíteos e medula óssea.

Transcrições específicas das citocinas foram observadas em baixas proporções exceto nos meses 9, 10 e 11 após a infecção onde houve aumento de IFN- γ , IL-2 mRNA, IL-12 e IL-10 foram detectadas esporadicamente apenas em poucos animais. A baixa proporção de cães expressando citocinas específicas, durante os primeiros 8 meses de infecção associada a evidências de dispersão do parasita sem sinais clínicos de doença, sugere a ocorrência de um “estabelecimento silencioso” do parasita evitando reação imunológica adversa mediada por células hospedeiras.

A resposta imune humoral apresentada nesses animais, nem a imunossupressão mediada por células, nem a gravidade da doença podem estar relacionadas com a expressão de IL-10. A predominância de uma resposta do tipo Th1 por um período relativamente curto indica que essas citocinas são necessárias para controlar a infecção, retardando o aparecimento da doença progressiva.

Rodríguez-Cortés e colaboradores (2007) ao realizar um estudo da infecção experimental canina, utilizaram 6 cães infectados com *L. infantum* via intravenosa monitorados durante um ano. Os animais desenvolveram sinais clínicos e patológicos compatíveis com a LVC. A avaliação dos parâmetros clínicos, imunológicos e parasitológicos mostrou que a intensidade da infecção por *Leishmania* em amostras de sangue, indicada pela quantidade de DNA de *Leishmania*, correlacionou-se significativamente com as concentrações de IgG, IgG1, IgG2, IgA e IgM e com sinais clínicos. Parasitemia e imunidade mediada por células específicas de *Leishmania* foram inversamente correlacionadas. Além disso, quantidades maiores de DNA de *Leishmania* foram detectadas no fígado, baço, linfonodo, pele e medula óssea de cães exibindo sinais clínicos do que aqueles exibindo poucos desses sinais. Esses achados sugerem que a doença progressiva na LVC experimental está associada à falta de responsividade de células T específicas e respostas humorais desprotetivas que permitem a disseminação e multiplicação de *L. infantum* em diferentes tecidos.

5. JUSTIFICATIVA

Poucos trabalhos na literatura fazem descrições sistêmicas de lesões anatomopatológicas de **cães experimentalmente infectados** por diferentes cepas. Trabalhos anteriores evidenciaram o cão com LVC como modelo de doença fibrosante, sendo que a fibrose foi analisada em cada órgão de forma isolada, isto é, não de forma simultânea. Então, neste trabalho, o objetivo foi avaliar a fibrose em cada cão nos três órgãos alvo (fígado, pulmões e rins), portanto de forma simultânea. Além disso, discutimos aqui a intensidade desse processo fibrótico ao se comparar os três órgãos de cães em diferentes condições experimentais.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Propõe-se um estudo quantitativo sobre a fibrilopoeise no (fígado pulmões e rins de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*).

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a fibrilopoeise no fígado, pulmões e rins utilizando coloração histológica especial e mensuração pela técnica de morfometria.
- Avaliar a deposição de colágeno tipo III (reticulina), fígado, pulmões e rins utilizando coloração histológica especial de prata amoniacal de Gomori e mensuração pela técnica de morfometria.
- Avaliar achados histológicos e parasitológicos do fígado, pulmões e rins
- Avaliar a expressão de marcadores de células mesenquimais (miofibroblastos) como os antígenos: α -SMA, vimentina, com posterior mensuração pela técnica de morfometria digital.
- Avaliar a expressão de marcadores de macrófagos do tipo 2 (M2) como o CD163 e do tipo 1 a Calprotectina (L1) com posterior mensuração pela técnica de morfometria digital.
- Avaliar a expressão da citocina tecidual TGF β 1 no fígado pulmões e rins utilizando imunomarcações com posterior mensuração pela técnica de morfometria digital.
- Avaliar a expressão gênica da citocina TGF β 1 no fígado, pulmões e rins por PCR em tempo real.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 AMOSTRAS E RANDOMIZAÇÃO DAS AMOSTRAS EM GRUPOS

Amostras de fragmentos de fígado, pulmões e rins, incluídos parafina foram selecionados previamente mediante confecção de lâminas histológicas e análise sob microscopia óptica convencional. Todas essas amostras são oriundas do acervo do laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL), coordenado pelo Prof. Wagner Luiz Tafuri, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). obtidas de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *L. infantum* classificados clinicamente em animais sintomáticos, com diagnóstico sorológico e parasitológico positivo. Todos os procedimentos experimentais adotados neste projeto foram aprovados em conformidade com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal em Pesquisa, e têm aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal – CEUA - da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo de número 204/2018.

Ambos os grupos experimentais são compostos por **cães** da raça Beagle, 3 meses de idade, ambos os sexos, adquiridos do canil Tad's Henriques, Colombo, Paraná, Brasil, área geográfica não endêmica de leishmaniose visceral. As amostras de fígado, pulmões e rins foram randomizadas em grupos obedecendo a seguinte ordem:

Grupo I - Cães experimentalmente infectados (BH401 e BH400):

- (1) **Grupo BH 401:** Composto por 5 cães experimentalmente infectados com a cepa MCAN BR/2002/BH401 de *L. infantum*;
- (2) **Grupo BH 400:** Composto por 5 cães experimentalmente infectados com a cepa MCAN/BR/2000 /BH400.

Grupo II - Cães naturalmente infectados (controle positivo):

Composto por 10 cães obtidos dos Centros de Zoonoses, durante inquérito epidemiológico, do município de Ribeirão das Neves, Minas Gerais (MG) (região metropolitana de Belo Horizonte, MG) e 10 cães do município de Januária (MG), norte do estado todos infectados com *L. infantum*, com diagnóstico sorológicos e parasitológicos positivos.

Grupo III - Cães não infectados (Grupo Controle):

O grupo controle foi constituído por 4 amostras de cães da raça Beagle, 35 meses de idade de ambos sexos, adquiridos do canil Tad's Henriques, Colombo, Paraná, Brasil, área geográfica não

endêmica de leishmaniose visceral. Os cães foram mantidos nos canis do ICB da mesma maneira como descrito. Esses animais também serviram como sentinelas no canil durante o protocolo experimental tendo todos eles PCR negativo para DNA de *Leishmania*. A eutanásia desses animais ocorreu juntamente com as do grupo BH401.

7.2 PROTOCOLO CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Os cães foram mantidos nos canis do ICB com alimentação e água *ad libitum* e vacinados (raiva, cinomose, hepatite / adenovírus tipo 2, leptospirose e parvovírus). Antes da infecção experimental, amostras de sangue foram coletadas para avaliações sorológicas e nenhum animal mostrou níveis detectáveis de anticorpos anti- *Leishmania*. Esses mesmos cães foram distribuídos em três grupos experimentais: (a) Grupo BH401 constituído de cinco cães infectados unicamente com *L. infantum* cepa MCAN/BR/2002/BH401. Os cães desse grupo foram inoculados na dose de 5×10^7 promastigotas/mL de *L. infantum*, via endovenosa. A infecção experimental ocorreu aos 11 meses de vida de cada animal e o intervalo de tempo de acompanhamento da infecção foi de 24 meses; (b) Grupo BH400 constituído por 11 cães infectados com *L. infantum* cepa MCAN/BR/2000/BH400. Os cães desse grupo foram inoculados com formas promastigotas de *L. infantum* na dose de 5×10^7 parasitos /mL, via endovenosa. A infecção experimental também ocorreu aos 11 meses de vida de cada animal, mas o intervalo de tempo de acompanhamento da infecção foi de 18 meses.

7.3 HISTOLOGIA

A principal finalidade da avaliação histopatológica foi a de analisar a integridade tecidual dos fragmentos representativos dos órgãos relevantes (Fígado, pulmões e rins) associados às principais alterações histológicas. Os blocos de parafina foram cortados, com 3-4 μ m de espessura, em micrótomo e montados em lâminas previamente desgorduradas com solução álcool-éter. Em cada lâmina foram colocados dois a três cortes. Colorações rotineiras de Hematoxilina-Eosina (HE) foram realizadas para todas as amostras pesquisadas. As lâminas histológicas foram analisadas em microscopia de luz de maneira qualitativa e semi-quantitativas. A análise semi-quantitativas foi realizada sob análise microscópica de luz com objetiva de 20x. De acordo com a intensidade do processo inflamatório crônico difuso e/ou focal no parênquima do fígado, pulmões e rins, as lâminas histológicas contendo os fragmentos dos respectivos órgãos foram assim classificadas: discreta, quando havia até 25% de acometimento; moderado de 25 a 50% de acometimento; intensa quando acima de 50% de acometimento.

7.4 ANÁLISE DAS FIBRAS COLÁGENAS

Para marcação das fibras reticulares empregou-se a técnica histoquímica da prata amoniacal de Gomori, nas quais as fibras são detectadas em pela coloração negra. As etapas da técnica podem ser assim resumidas: as lâminas foram desparafinadas em xilol por cerca de 20 minutos, hidratadas em ordem decrescente de álcoois, do absoluto ao 70%, finalizando com banho em água corrente. Cada lâmina foi coberta com solução aquosa de permanganato de potássio 0,5%, por aproximadamente 2 minutos, até que atinjam a cor marrom claro. Posteriormente, adicionou-se solução aquosa de ácido oxálico 3% até que os cortes fiquem esbranquiçados. As lâminas foram sensibilizadas em sulfato férrico amoniacal 2%, por 2 minutos, e lavadas em banho de água destilada por cinco minutos. Após este passo, as lâminas são impregnadas com prata amoniacal de Gomori, por cerca de dois ou três minutos, sendo posteriormente adicionada solução aquosa de formol 20% onde é possível observar o enegrecimento das secções histológicas. A seguir, as lâminas são mergulhadas em solução aquosa de cloreto de ouro 0,2%, por três minutos, e cobertas com hipossulfito de sódio 2%, por um minuto. Para a conta coloração os cortes são cobertos com Verde Luz 1%, por 30 segundos. Entre a aplicação de cada uma das soluções, exceto a de sulfato férrico amoniacal, as lâminas são lavadas de maneira rápida com água destilada. Posteriormente, é realizada desidratação, diafanização e montagem em Entellan[®] (Entellan[®], 107960 - Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

7.5 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE α -SMA, VIMENTINA, DE CD163, CALPROTECTINA (L1) E TGF β 1 (TGF-B1)

Após os cortes histológicos, as secções dos tecidos foram montadas em lâminas previamente desgorduradas, com álcool-éter, e banhadas em solução gelatinosa de fixação.

Pré Tratamento: para a recuperação antigênica foi empregada uma metodologia por alta temperatura utilizando solução tampão retrievever citrato 0,1% (pH 6.0) (DAKO[®], Vila Real Carpinteria, CA, code S1699). Para α -SMA e vimentina a solução retrievever foi pré-aquecida, em banho-maria, durante 05 minutos a 97°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas, em banho-maria, durante 30 minutos, a 97°C. Para a reativação antigênica do CD163, L1, TGF β , as lâminas foram incubadas na solução retrievever utilizando panela de pressão (Pascal Pressure Cooker, Dako[®] Cytomation, Model: S2800, USA) por 1 minutos, a 126°C.

Bloqueio da peroxidase endógena e de sítios inespecíficos: para o bloqueio da peroxidase endógena, dois banhos de 15 minutos cada foram feitos utilizando uma solução de peróxido

de metanol. A solução empregada era constituída por 90% de álcool metílico (CH₃OH), 3,3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30 v/v) e 6,7% de água destilada (H₂O_d).

Para o Bloqueio dos sítios inespecíficos: o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado incubando as lâminas em uma solução de leite em pó desnatado, 24%, diluído em PBS 1X, em temperatura ambiente durante 30 minutos.

Incubação do anticorpo primário: foram colocados em cada fragmento tecidual seus respectivos anticorpos, diluídos previamente e incubados em câmara úmida por 18h a 4°C (Tabela 1). Para o controle negativo, apenas PBS foi adicionado aos cortes substituindo o anticorpo primário. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS, três vezes por 5 minutos e incubados por 30 minutos com anticorpo secundário estreptoavidina-peroxidase (Dako®, LSAB2 kit, Carpinteria, CA, USA) incubadas novamente em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0.024% em PBS, por cinco minutos em temperatura ambiente. Posteriormente fez-se a lavagem das lâminas em água-corrente e contra coloração em Hematoxilina de Harris. Finalmente, as Lâminas foram desidratadas em álcoois crescente (70%, 80%,90% e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e montadas em Entellan®.

ANTÍGENO	FORNECEDOR	CLONE	DILUIÇÃO
CD163	Santa Cruz Biotechnology	Ed2	1:100
Calprotectina (L1)	Dako	Mac387	1:100
TGFβ1	Bio-Rad	V9	1:100
α-SMA	Dako	1a4	1:60
Vimentina	Dako	V9	1:70

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica.

7.6 TÉCNICA DA ESTREPTOAVIDINA-PEROXIDASE PARA DETECÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA* NOS FRAGMENTOS DE FÍGADO, PULMÕES E RINS PARAFINADOS

As lâminas contendo cortes parafinados de tecidos renais cortados na espessura de 3 µm foram desparafinadas em 2 banhos de xilol por 15 minutos cada, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes e submetidas a um banho em PBS (“Phosphate Buffer Saline” -pH 7,2, 0,01M) a 10%. Posteriormente fez-se o bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS o, peróxido de hidrogênio (30 volumes diluída a 4% em PBS), por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram cobertas com solução de bloqueio (leite em pó desnatado diluído em PBS -12g de leite em 200 mL de PBS).

Logo após o anticorpo primário (soro de cão infectado com *L. infantum* na diluição de 1/50 em PBS-BSA (soro albumina bovina) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C. A seguir, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1/100 (DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675), segundo (Tafari et al., 2004) sendo as lâminas novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente.

Adicionou-se, então, o complexo estreptavidina peroxidase seguido de incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 0,16% em PBS, por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente fez-se a lavagem das lâminas em água corrente e contra coloração com hematoxilina de Harris.

As lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois 70 %, - álcool absoluto), diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan® Para cada bateria de lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. Como controle negativo, utilizou-se PBS-BSA, em substituição ao anticorpo primário. Como controle positivo foi utilizado uma lâmina com corte histológico de pele de orelha de um cão naturalmente infectado com *Leishmania* com parasitismo cutâneo intenso. A avaliação das amostras foi realizada através da quantificação no software Ks300.

7.7 MORFOMETRIA DIGITAL

7.7.1 Técnica de morfometria

Para a realização da técnica de morfometria, inicialmente foram capturadas 20 imagens de cada lâmina, para cada uma das marcações propostas anteriormente, empregando o aumento de 400x no microscópio (Olympus®, USA). Para avaliação do colágeno, α -SMA e vimentina foram excluídas as áreas de veia centro lobular e portal, para fígado. Posteriormente, para a avaliação da marcação pela prata amoniacal de Gomori e das marcações pela imunohistoquímica foi usado uma sequência de algoritmos do programa KS300 (Carl Zeiss®, Germany), da área total de deposição das fibras de colágeno e da área imunomarcada (μm^2) das quais cada imagem foram calculadas selecionando os pixels com tons de preto e castanho e subsequentemente foi criada uma imagem binária (Melo et al., 2008; Melo et al., 2009; Da Silva et al., 2012; Madeira et al., 2016) (Figura1).

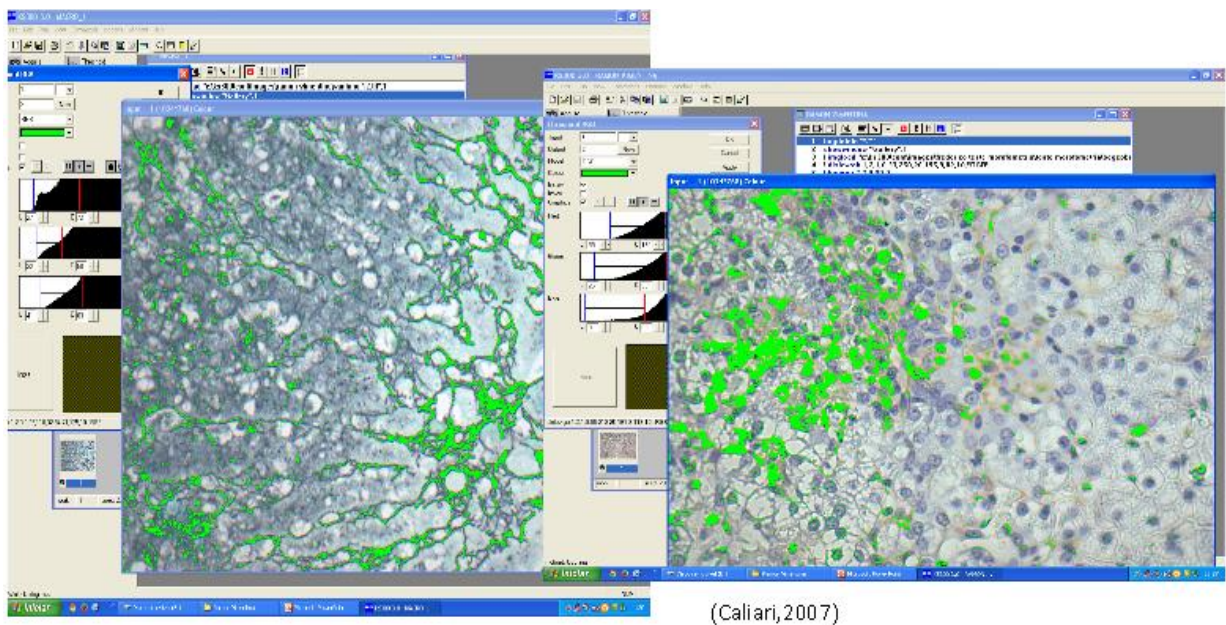


Figura 1: Imagens da área correspondente a fibras reticulares e vimentina marcadas quantificadas pelo software KS300.

7.7.2 Análise estatística individual do colágeno III, α -SMA, vimentina e TGF- β 1

As áreas totais ocupadas por fibras de colágeno, α -SMA, vimentina e TGF- β 1 foram medidas em 20 campos por animal. Este número de campos garantiu uma medida estável e confiável com variância inferior a 5%. Os dados de área ocupada por colágeno, α -SMA, vimentina e TGF- β 1 foram submetidos aos testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk usando o software R), teste de homocedasticidade (teste de Levene) e teste de Durbin-Watson

para erros auto correlacionados no pacote car. do software R (Fox & Weisberg, 2018). Como os pressupostos de normalidade e homocedasticidade da Análise de variância (ANOVA) não foram atendidos, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis usando o pacote agricolae (Mendiburu, 2015), em seguida, o teste de Conover para comparações múltiplas de amostras independentes usando o pacote PMCMR (Pohlert et al., 2014). Essas análises estatísticas foram realizadas com o software R (R CoreTeam, 2020).

Como as áreas ocupadas por fibras de colágeno, α -SMA, vimentina e TGF- β 1 no fígado, pulmão e rim não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$ no teste de Shapiro-Wilk), a força de associação entre essas áreas dessas moléculas no fígado e pulmão, fígado e rim e pulmão e rim foram medidos pelo coeficiente de correlação de Spearman. Essas análises estatísticas foram realizadas por meio do programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2015). Para todas as análises estatísticas, as diferenças foram consideradas significativas quando $p > 0,05$.

7.8 ISOLAMENTO DO RNA E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR

Devido à baixa de deposição de colágeno no grupo BH 400 avaliada pela técnica da prata amoniacal de gomori optou-se por realizar a análise da expressão gênica do TGF β 1 apenas nos grupos BH 401, controle positivo e negativo.

O RNA total foi isolado das amostras congeladas após homogeneização com o Trizol® reagente (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A amostra foi incubada com clorofórmio, agitando vigorosamente à mão por 45 segundos e centrifugado por 12.000xg durante 15 minutos a 4 ° C. A fase aquosa que contém o RNA foi transferida para um tubo novo e misturado com álcool isopropílico para precipitação.

O sobrenadante foi removido e o pellet de RNA foi lavado uma vez com etanol 75%. No final, o sedimento foi seco brevemente, redissolvido em água de grau molecular DPEC. Todas as amostras foram pré-tratadas com DNase I por 15 minutos (Invitrogen) para remover o material genômico indesejado. O RNA foi quantificado usando um espectrofotômetro (NanoDrop Lite -Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA).

Para obtenção de DNA complementar (cDNA), foram utilizados 1000 ng de RNA, o M-Kit de transcriptase reversa MLV (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) e o primers reversos (Tabela 2). Depois de desnaturar o RNA modelo e os primers a 70 ° C para 10 min, 50 U de transcriptase reversa foi adicionada na presença de tampão RT (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de mistura de dNTP e 40 U de RNase inibidor. A mistura (20 μ l) foi incubada a 40 ° C por 1 hora.

	SEQUÊNCIA (5´- 3)	TAMANHO
TGFβ1	CCTGCTGAGGCTCAAGTTAAAAG	
Senso		81 bp
Anti-senso	CTGAGGTAGCGCCAGGAATC	

Tabela 2 - Oligonucleotídeos usados no PCR em tempo real.

7.9 PCR EM TEMPO REAL

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT PCR) foi realizada em um Applied BioSystems StepOne™ usando o corante fluorescente Power SYBR Green Master Mix (Applied BioSystems, Foster City, CA). Todas as amostras foram executadas em duplicata em 96 poços de placas ópticas de PCR (Applied BioSystems) em um volume final de reação de 20 µl. O PCR os parâmetros foram 1 ciclo a 50 ° C por 2 min, 1 ciclo a 95 ° C por 10 min, 40 ciclos a 95 ° C por 15 se 60 ° C por 1 min.

Os primers usados para amplificação por PCR estão listados na Tabela 2. O gene que codifica a hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT) foi usada como controle interno. Os iniciadores foram concebidos para abranger as fronteiras intrão-exão e, assim, anelar apenas com cDNA. Não amplificação de fragmentos ocorreu em amostras de controle negativo preparadas sem transcriptase reversa. A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada pelo pico único curvas de dissociação.

7.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DA EXPRESSÃO GÊNICA

Os resultados da PCR em tempo real foram expressos como ΔCT , que é o limite do ciclo (Ct) do gene alvo menos o Ct do gene de referência, HPRT. O gene relativo expressão foi calculada como mudança de vezes usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT$ é o ΔCT do grupo de cães infectados naturalmente menos o ΔCT do grupo de controle (sem animais infectados). A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism 8. Os grupos foram comparados usando o teste U de Mann-Whitney e $P > 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

8. RESULTADOS

8.1 Análise histopatológica do fígado de cães experimentalmente e naturalmente (controle positivo) infectados

Ao exame microscópico, todos os fragmentos de fígado (Figura 2 A-C). dos grupos de animais infectados apresentaram hepatite crônica caracterizada pela presença de um exsudato de células mononucleares (plasmócitos, linfócitos e macrófagos) localizados no espaço subcapsular, portal e intralobular, e não raro formando granulomas de fato, observou-se a formação de granulomas intralobulares constituídos por macrófagos epitelióides (muitas vezes parasitados), linfócitos e plasmócitos. Importante salientar que esses granulomas foram observados em todos os cães do Grupo BH401 e naturalmente infectados, mas não nos cães dos grupos BH400 e controle-negativos, outras alterações histológicas como a hiperplasia e hipertrofia das células de Küpffer, congestão sinusoidal, degeneração hidrópica e gordurosa (esteatose) seguem descritas nas tabelas 2,3,4,5 e 6.

GRUPO BH 401 (N=5)	% DE CASOS	N
Hiperplasia e Hipertrofia das células de Küpffer	100%	5
Congestão sinusoidal moderada	80%	4
Inflamação granulomatosa intensa multifocal	100%	5
Degeneração hidrópica intensa e difusa	100%	5
Esteatose moderada e difusa	60%	3
Necrose moderada e multifocal	40%	2

Tabela 3: Análise histopatológica do fígado de cães experimentalmente infectados (BH 401) por *Leishmania infantum*.

GRUPO BH 400 (N=5)	CASOS	N
Hiperplasia e Hipertrofia das células de Küpffer	40%	2
Congestão sinusoidal moderada	80%	4
Inflamação granulomatosa discreta multifocal	40%	2
Degeneração hidrópica moderada e difusa	40%	2

Tabela 4: Análise histopatológica do fígado de cães experimentalmente infectados (BH 400) por *Leishmania infantum*.

GRUPO CONTROLE POSITIVO (N=20)	% DE CASOS	N
Hiperplasia e Hipertrofia das células de Küpffer	100%	20
Congestão sinusoidal moderada	80%	16
Inflamação granulomatosa intensa multifocal	50%	10
Degeneração hidrópica intensa e difusa	100%	20
Esteatose moderada e difusa	60%	12
Necrose moderada e multifocal	40%	8

Tabela 5: Análise histopatológica do fígado de cães naturalmente infectados (controle positivo) por *Leishmania infantum*.

GRUPO CONTROLE NEGATIVO (N=4)	% DE CASOS	N
Inflamação de polimorfonucleares discreta	25%	1
Esteatose discreta e multifocal	50%	2
Degeneração hidrópica discreta e difusa	100%	4

Tabela 6: Análise histopatológica do fígado de cães negativos (controle negativo) pela infecção por *Leishmania infantum*.

8.2 Análise histopatológica do pulmão de cães naturalmente e experimentalmente infectados

Microscopicamente, a principal lesão encontrada no pulmão de todos os animais foi a pneumonite intersticial crônica e difusa, constituída de um infiltrado inflamatório crônico predominantemente composto de plasmócitos, linfócitos e macrófagos, variando de discreto a intenso nos animais naturalmente infectados e nos animais infectados pela cepa BH 401 (Figura 2 E-H). Todavia, nos animais infectados pela cepa BH 400 e controle negativo a pneumonite apresentou-se de forma discreta ou mesmo ausente. A hipertrofia e hiperplasia dos pneumócitos foi encontrada nos animais naturalmente infectados e nos animais experimentalmente infectados pela cepa BH 401 (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11).

GRUPO BH 401 (N=5)	% DE CASOS	N
Pneumonite intersticial crônica intensa	100%	5
Hipertrofia e hiperplasia dos pneumócitos	100	5

Tabela 7: Análise histopatológica do pulmão de cães experimentalmente infectados (BH 401) por *Leishmania infantum*.

GRUPO BH 400 (N=5)	% DE CASOS	N
Pneumonite intersticial crônica discreta	80%	4
Hipertrofia e hiperplasia dos pneumócitos discreta	80%	4

Tabela 8: Análise histopatológica dos pulmões de cães experimentalmente infectados (BH 400) por *Leishmania infantum*.

GRUPO CONTROLE POSITIVO (N=20)	% DE CASOS	N
Pneumonite intersticial crônica intensa	30%	6
Pneumonite intersticial crônica moderada	70%	14
Hipertrofia e hiperplasia dos pneumócitos	100%	20

Tabela 9: Análise histopatológica do pulmão de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

GRUPO CONTROLE NEGATIVO (N=4)	% DE CASOS	N
Pneumonite intersticial crônica intensa	75%	3

Tabela 10: Análise histopatológica dos pulmões de cães negativos (controle negativo) pela infecção por *Leishmania infantum*.

8.3 Análise histopatológica do rim de cães naturalmente e experimentalmente infectados

Todos os animais experimentalmente infectados apresentaram glomerulonefrites crônica do tipo membranoproliferativa (GCM), membranosa (GM) e esclerosante (GS) (Figura 2 I-L). Os animais infectados pela cepa BH 401 apresentaram glomerulonefrite do tipo membranoproliferativa membranosa e esclerosante, principalmente. Os animais dos grupos infectados pela cepa BH 400 e controle não apresentaram lesões renais evidentes. A nefrite intersticial crônica caracterizada pelo infiltrado celular de mononucleares (plasmócitos, linfócitos e macrófagos) foi visualizada em todos os animais infectados do

grupo BH 401 e naturalmente infectados, mas não no grupo BH400 e no grupo controle-negativos (tabelas 12 e 13).

GRUPO BH 401 (N=5)	% DE CASOS	N
GCM	40%	2
GS	80%	3
GM	20%	1

Tabela 11: Análise histopatológica dos rins de cães experimentalmente infectados (BH 401) por *Leishmania infantum*.

GRUPO BH 400 (N=5)	% DE CASOS	N
GCM	20%	1
GM	80%	3

Tabela 12: Análise histopatológica dos rins de cães experimentalmente infectados (BH 400) por *Leishmania infantum*.

GRUPO CONTROLE POSITIVO (N=20)	% DE CASOS	N
GCM	80%	16
GS	20%	4
GM	20%	4
Nefrite intersticial +++	100%	25

Tabela 13: Análise histopatológica dos rins de cães naturalmente infectados (controle positivo) por *Leishmania infantum*

GRUPO CONTROLE NEGATIVO (N=20)	% DE CASOS	N
Ausência de lesões	100%	4

Tabela 14: Análise histopatológica dos rins de cães negativos (controle positivo) para a infecção por *Leishmania infantum*

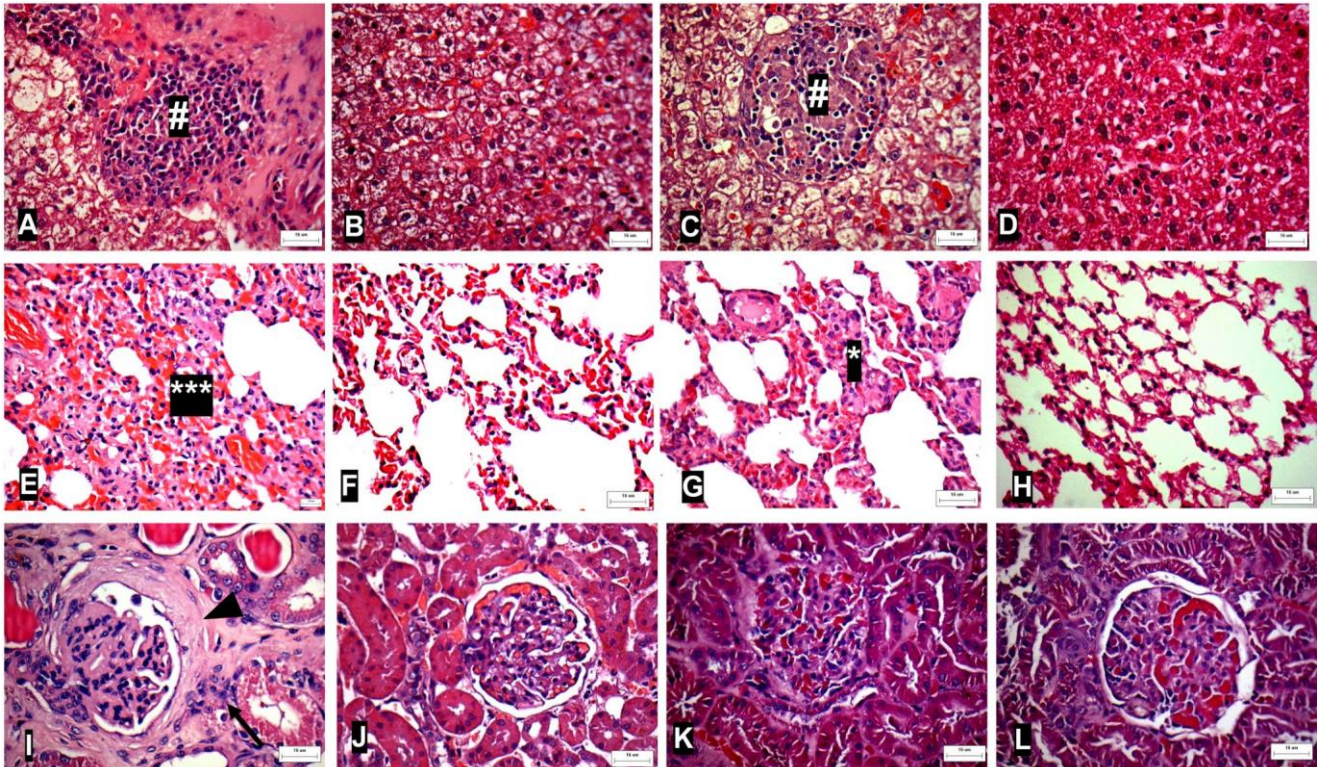


Figura 2: (A-L) Secções de fígados, pulmões e rins corados em hematoxilina e eosina (H&E) de fígado, pulmão e rim de cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 µm (A-D) Fígado: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo Bh 400 (C) Grupo controle positivo (D) Grupo controle negativo. # Granuloma intralobular composto por macrófagos, células epitelióides e linfócitos. Pulmões: (E) Grupo BH 401 (F) Grupo BH 400 (G) Grupo controle positivo (H) Grupo controle negativo. *** Pneumonite intersticial crônica. (I) Rim: (I) Grupo BH 401 (J) Grupo BH 400 (K) Grupo controle positivo (L) Grupo controle negativo. Seta: Glomerulonefrite esclerosante.

8.4 Análises da carga parasitária pela técnica de imunohistoquímica

Após análise da carga parasitária mediante emprego da imunohistoquímica para detecção de formas amastigotas as amostras de fígado revelaram que o grupo experimental BH 401 teve a maior carga parasitária em relação aos grupos experimental infectado com a cepa BH 400 e ao grupo controle positivo (gráfico 1). O mesmo se repetiu nos pulmões (gráfico 2) e rins (gráfico 3).

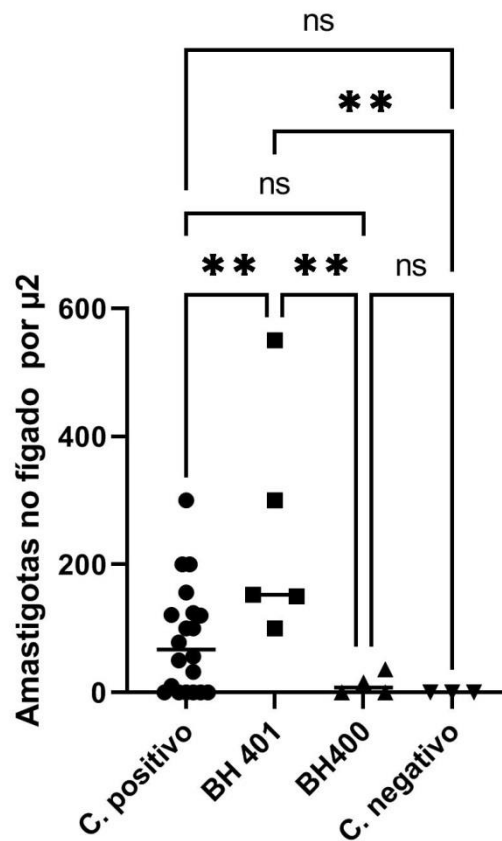


Gráfico 1: Carga parasitária no fígado avaliada em todas as condições experimentais: cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401 e BH 400, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo). Os resultados são exibidos como média± erro padrão da média, com n de 5 cães no grupo **BH 401**, 5 cães no grupo **BH 400**, 20 no grupo **controle positivo** e 4 no grupo **controle negativo**. a ** $p < 0,0024$ quando comparada ao b, c e d. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

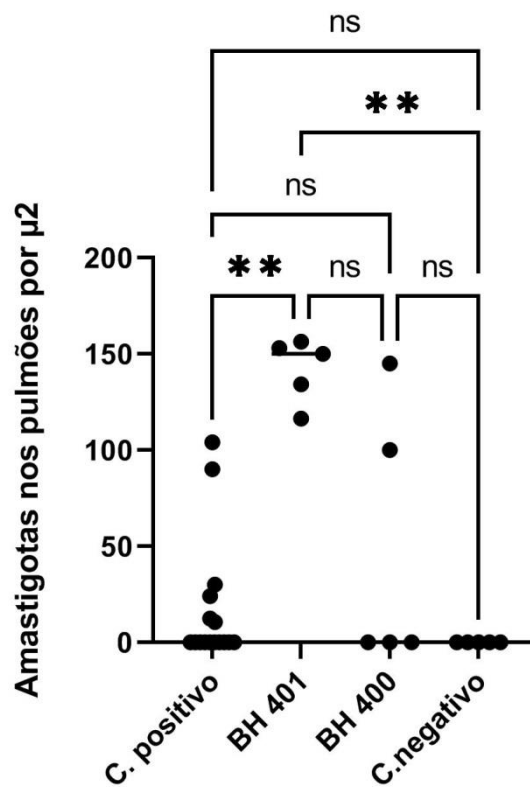


Gráfico 2: Carga parasitária nos pulmões avaliada em todas as condições experimentais: cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401 e BH 400, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 cães no grupo BH 401, 5 cães no grupo BH 400, 20 no grupo controle positivo e 4 no grupo controle negativo. C. positivo ** p 0,0030 quando comparada ao BH 401; BH 401 ** p < 0.0013. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

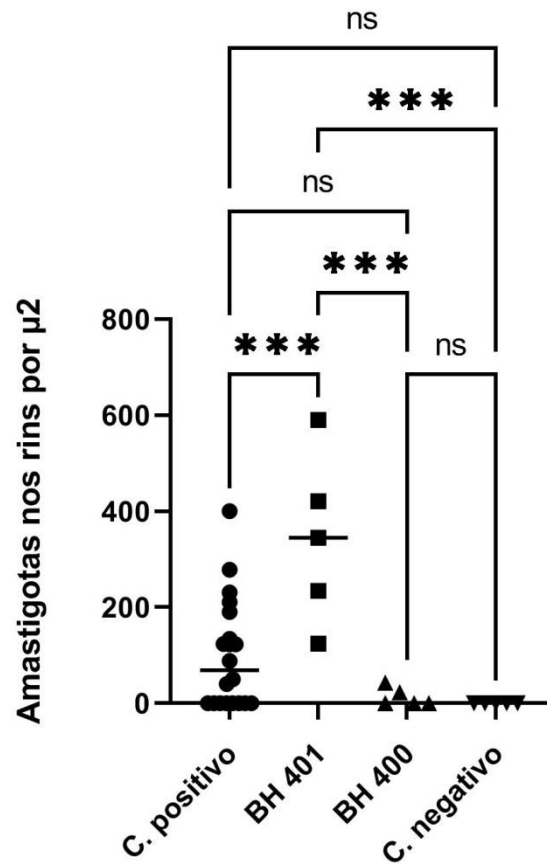


Gráfico 3: Carga parasitária nos rins avaliada em todas as condições experimentais: cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401 e BH 400, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo). Os resultados são exibidos como média ± erro padrão da média, com n de 5 cães no grupo BH 401, 5 cães no grupo BH 400, 20 no grupo controle positivo e 4 no grupo controle negativo. C. positivo ** $p < 0,0006$ quando comparada ao BH 401; BH 401 *** $p < 0,0003$ e BH 401 *** $p < 0,0002$ quando comparado ao C. negativo e d. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

8.5 Análise da expressão de Calprotectina (L1) e CD163 no fígado, pulmão e rim de cães experimentalmente e naturalmente infectados

As células positivas para os antígenos calprotectina (L1) (Figura 3 A-D; 4 A-D; 5 A-D) e CD163 (Figura 6 A-F) foram: as que compõe os granulomas hepáticos nos septos interalveolares nos pulmões nos glomérulos e túbulos nos rins. Após análise morfométrica, a expressão de Calprotectina (L1) no fígado (gráfico 4), pulmão (gráfico 5) e rim (gráfico 6) foram maiores nos animais experimentalmente infectados com a cepa BH 400 em relação aos animais naturalmente infectados e experimentalmente infectados (controle positivo) pela cepa BH 401 e ao grupo controle negativo. Entretanto, a expressão do antígeno CD 163 foi maior nos animais BH 401 em relação aos animais BH 400, naturalmente infectados e controle negativo em todos os órgãos (Gráficos 7, 8 e 9).

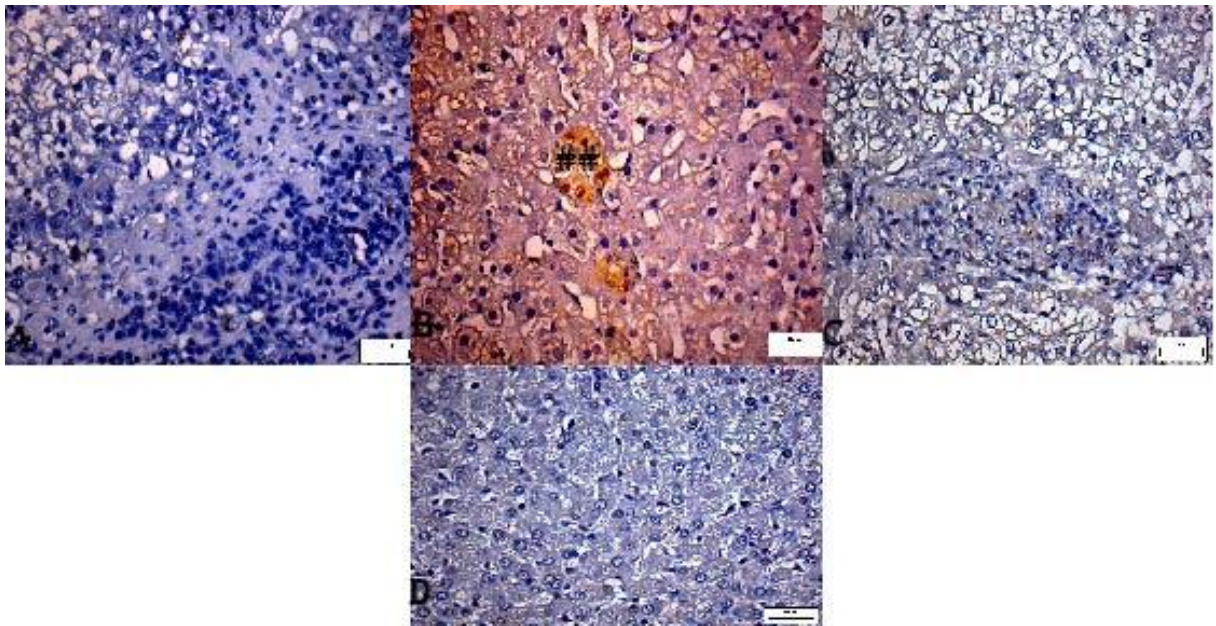


Figura 3: (A-D) Reação imunohistoquímica para Calprotectina (L1) em secções de fígados de cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 µm: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo BH 400 (C) Grupo Controle Positivo (D) Grupo controle negativo. ## Expressão de Calprotectina (L1) em granulomas hepáticos.

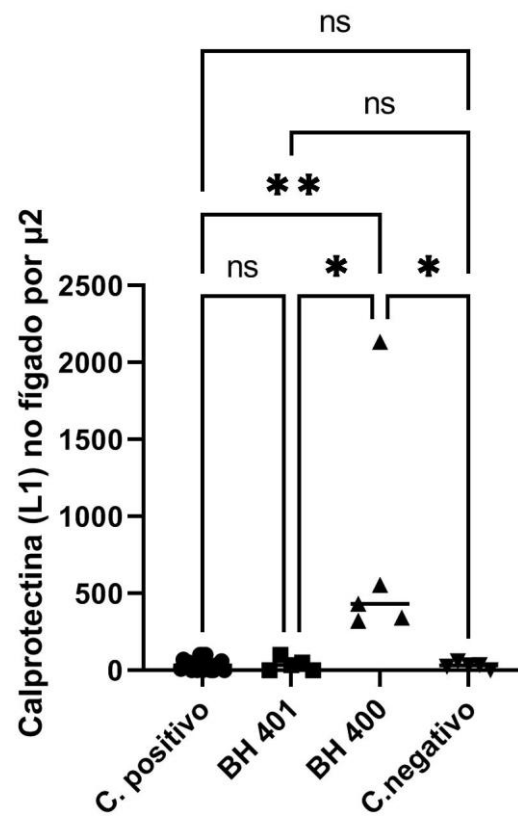


Gráfico 4: Reação imunohistoquímica para Calprotectina (L1) no fígado em todas as condições experimentais: Cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401 e BH 400, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo). Os resultados são exibidos como média± erro padrão da média, com n de 5 cães no grupo BH 401, 5 cães no grupo BH 400, 20 no grupo controle positivo e 4 no grupo controle negativo. C.positivo ** $p < 0,032$ quando comparada ao BH 400, BH 401 * $p < 0,0487$ ao BH 400 e. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

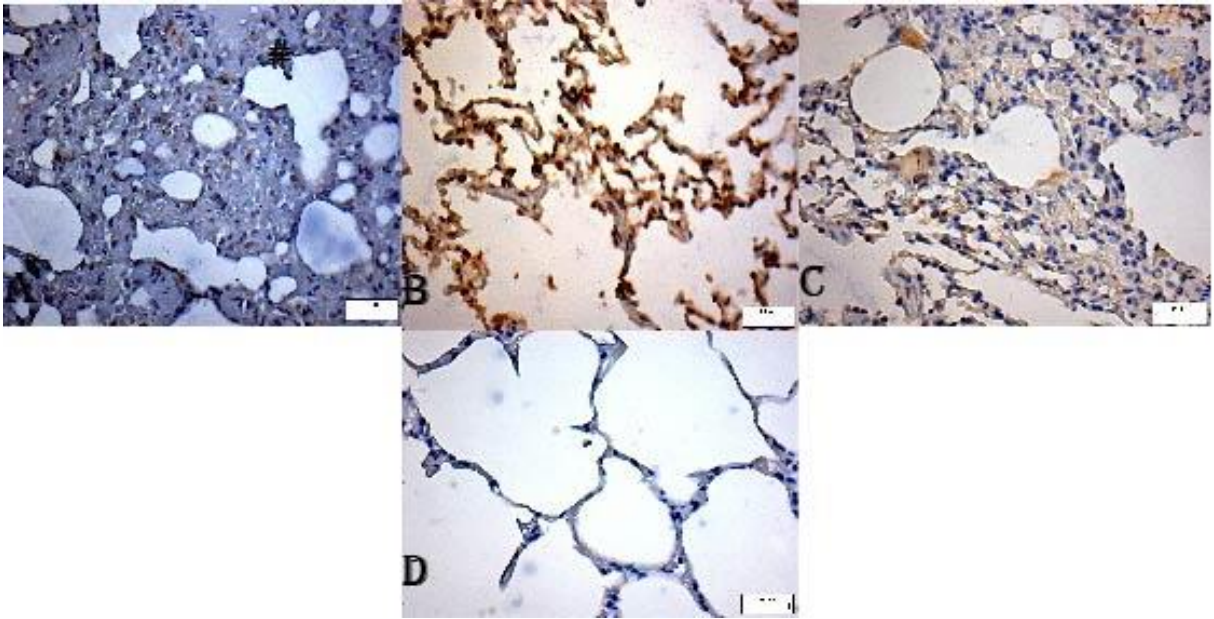


Figura 4: (A-D) Reação imunohistoquímica para Calprotectina (L1) em secções de pulmões de cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 µm: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo BH 400 (C) Grupo Controle Positivo (D) Grupo controle negativo. ## Expressão de Calprotectina (L1) em septos interalveolares com pneumonite intersticial crônica

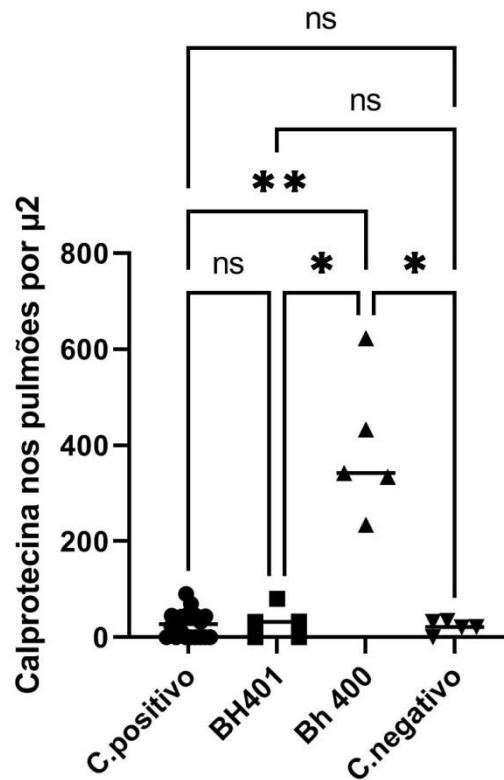


Gráfico 5: Reação imunohistoquímica para Calprotectina (L1) nos pulmões em todas as condições experimentais: Cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401 e BH 400, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo). Os resultados são exibidos como média± erro padrão da média, com n de 5 cães no grupo **BH 401, 5 cães no grupo **BH 400**, 20 no grupo **controle positivo** e 4 no grupo **controle negativo**. **C.positivo** ** $p < 0,0041$ quando comparada ao **BH 400**; **BH 401** * $p < 0,0342$ quando comparado ao **BH 400** e **BH 400** * $p < 0,0182$. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.**

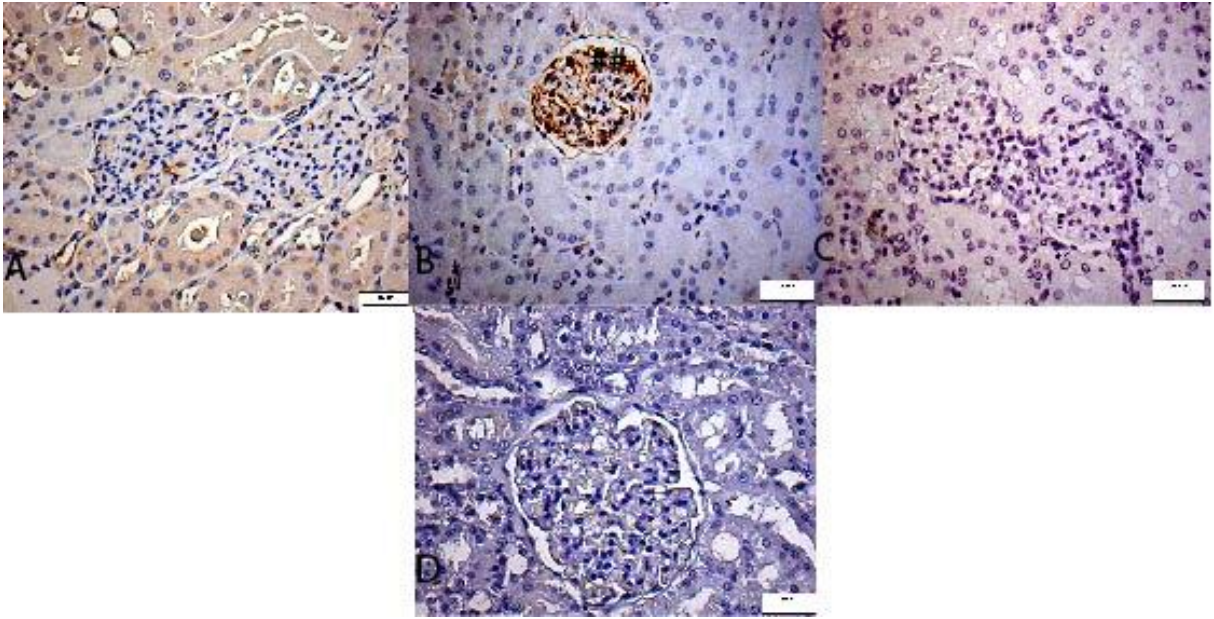


Figura 5: (A-D) Reação imunohistoquímica para Calprotectina (L1) em secções de rins de cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 μ m: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo BH 400 (C) Grupo Controle Positivo (D) Grupo controle negativo. ## Expressão de Calprotectina (L1) no glomérulo

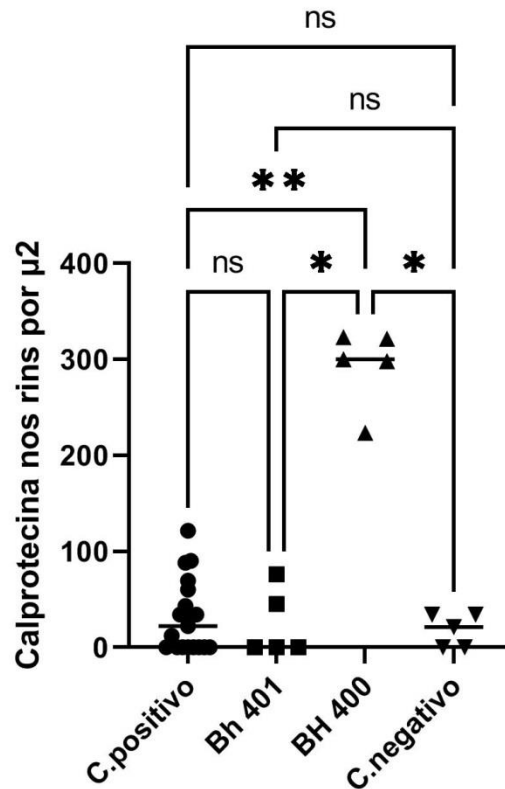


Gráfico 6: Reação imunohistoquímica para Calprotectina (L1) nos rins em todas as condições experimentais: Cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401 e BH 400, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo). Os resultados são exibidos como média ± erro padrão da média, com n de 5 cães no grupo BH 401, 5 cães no grupo BH 400, 20 no grupo controle positivo e 4 no grupo controle negativo. C. Positivo * *p< 0,0045 quando comparada ao BH 400, BH 401 *p< 0,0195 quando comparado ao BH 400 ; e BH 400 *p< 0,0157 comparado ao C. negativo. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

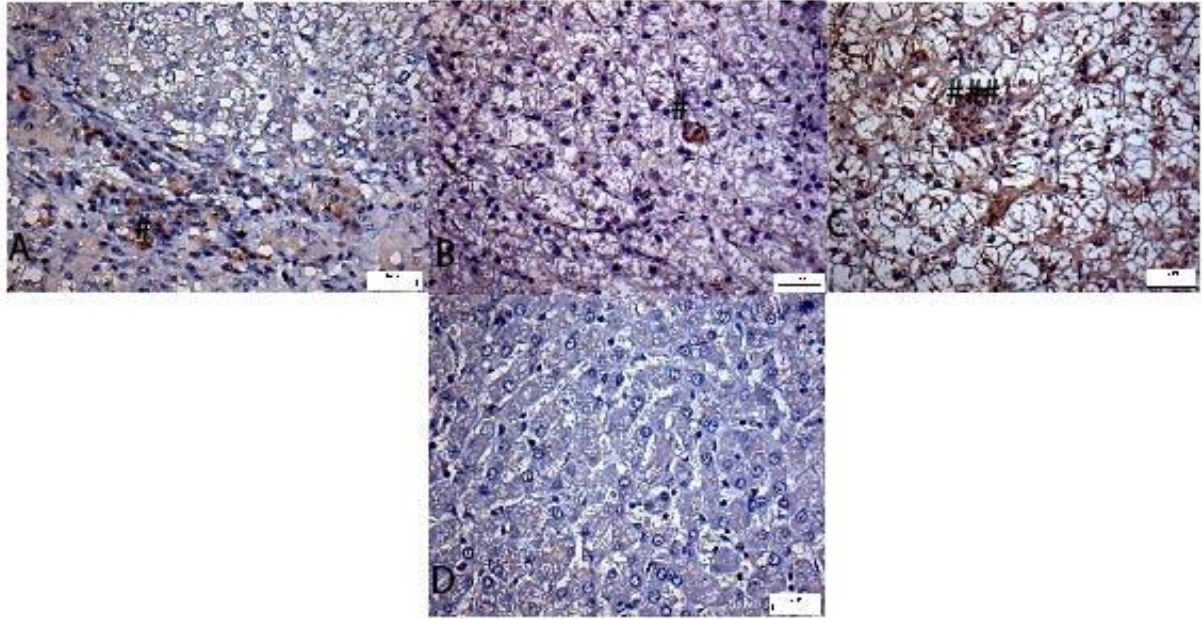


Figura 6: (A-D) Reação imunohistoquímica para CD163 em secções de fígado de cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 µm: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo BH 400 (C) Grupo Controle Positivo (D) Grupo controle negativo. ## Expressão de CD163 nos granulomas hepáticos

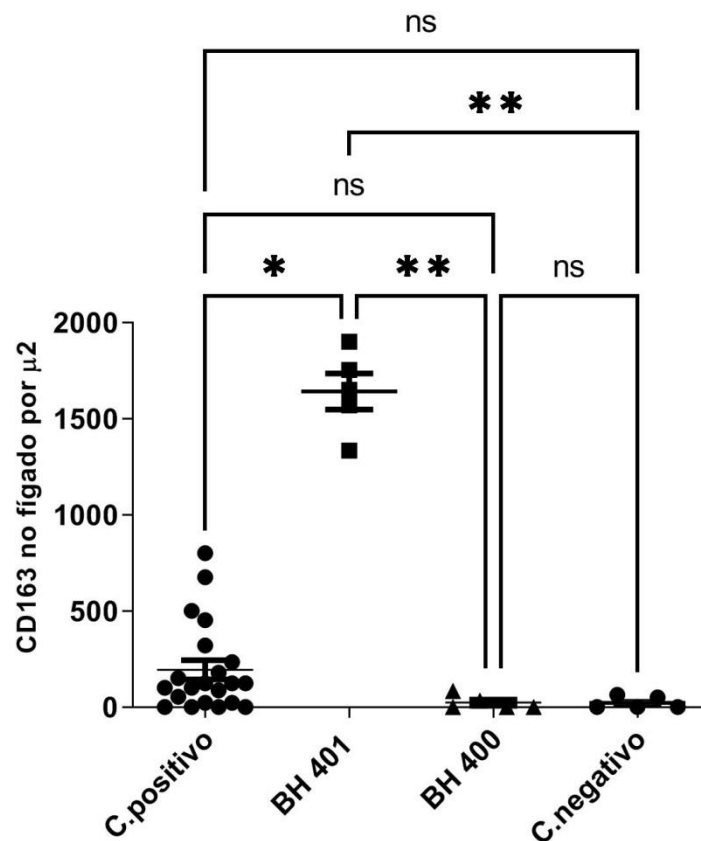


Gráfico 7: Reação imunohistoquímica para CD163 no fígado em todas as condições experimentais: Cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401 e BH 400, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo). Os resultados são exibidos como média ± erro padrão da média, com n de 5 cães no grupo BH 401, 5 cães no grupo BH 400, 20 no grupo controle positivo e 4 no grupo controle negativo. C. Positivo * $p < 0,0258$ quando comparado ao BH 401, BH 401 ** $p < 0,00011$ quando comparado ao BH 400 ; e BH 401 * $p < 0,0011$ comparado ao C. negativo. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

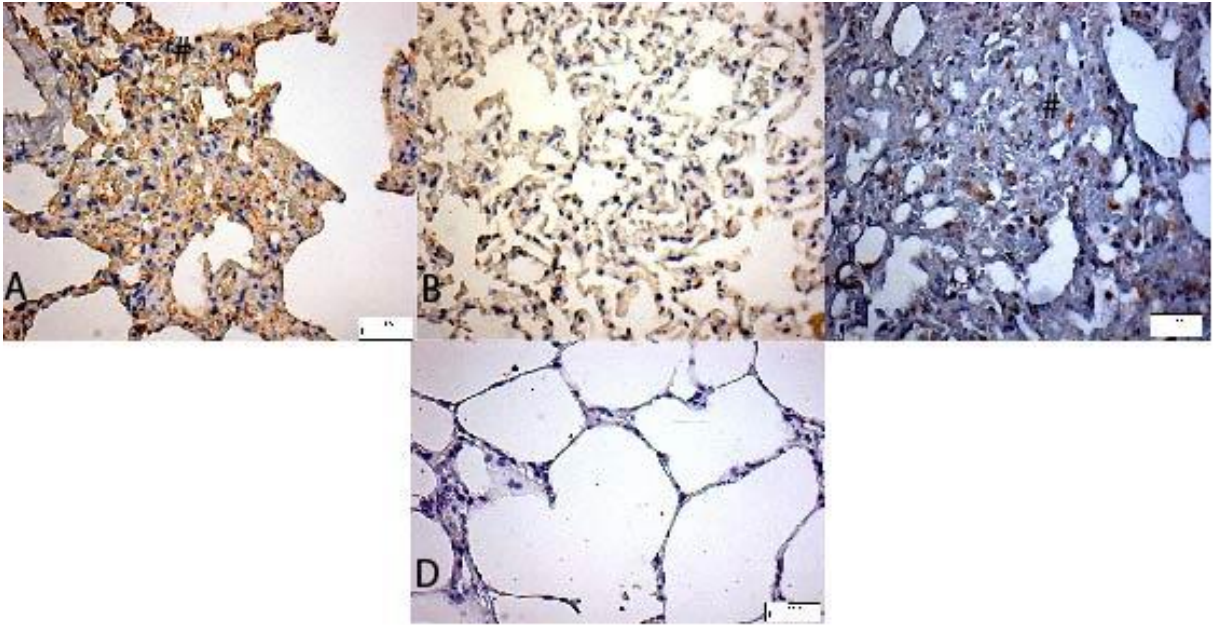


Figura 7: (A-D) Reação imunohistoquímica para CD163 em secções de pulmões de cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 µm: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo BH 400 (C) Grupo Controle Positivo (D) Grupo controle negativo. ## Expressão de CD163 nos septos interalveolares com pneumonite intersticial crônica

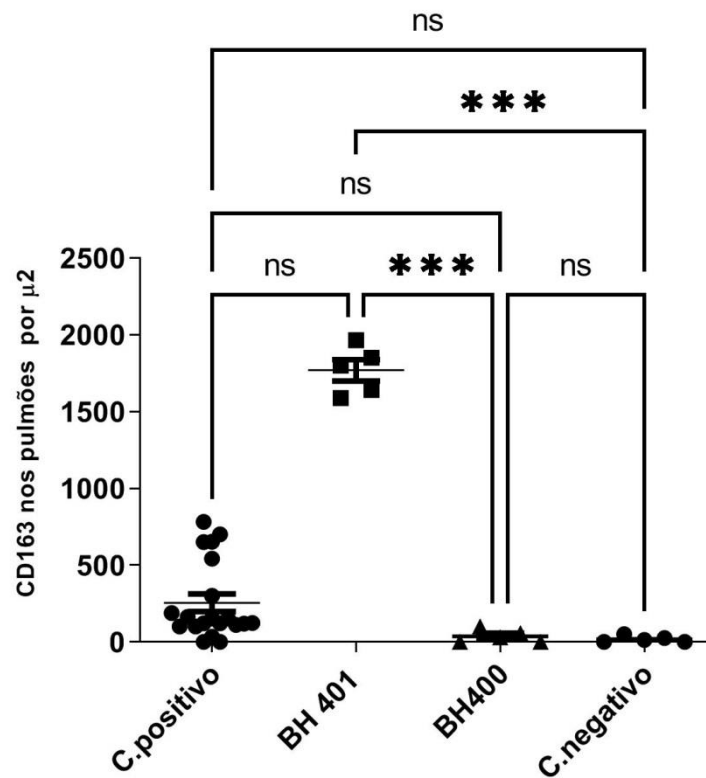


Gráfico 8: Reação imunohistoquímica para CD163 nos pulmões em todas as condições experimentais: Cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401 e BH 400, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 cães no grupo BH 401, 5 cães no grupo BH 400, 20 no grupo controle positivo e 4 no grupo controle negativo BH 401 ** * $p < 0,0008$ quando comparado ao BH 400, BH 401 * $p < 0,0003$ quando comparado ao BH 400. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.**

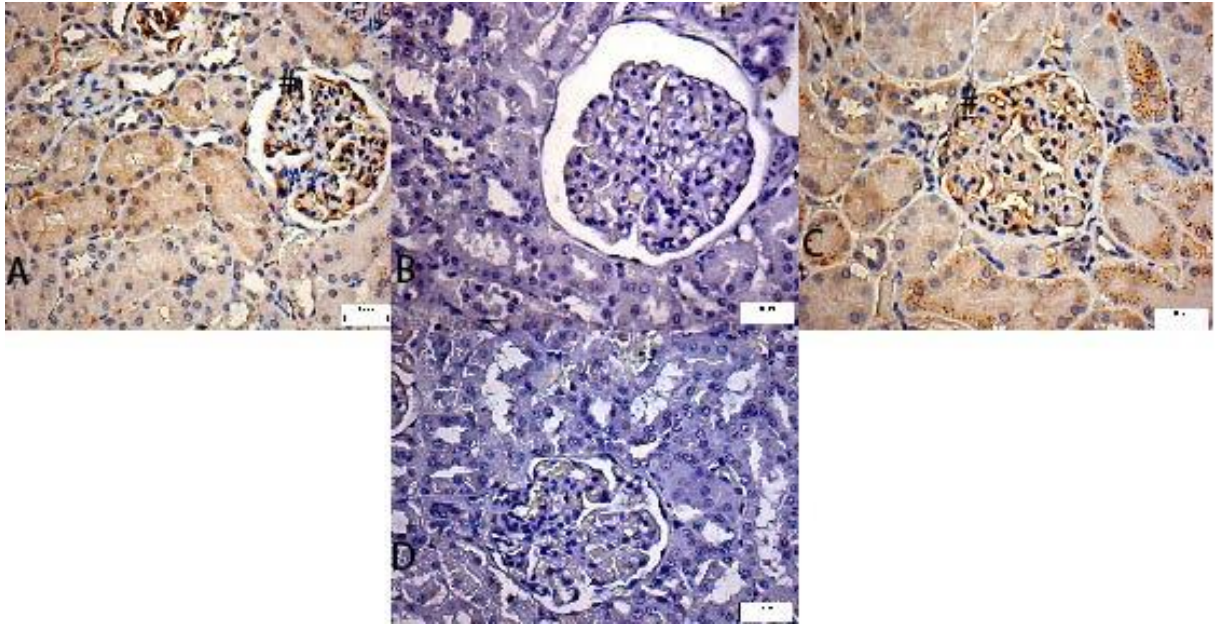


Figura 8: (A-D) Reação imunohistoquímica para CD163 em secções de rins de cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 µm: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo BH 400 (C) Grupo Controle Positivo (D) Grupo controle negativo. ## Expressão de CD163 nos glomérulos

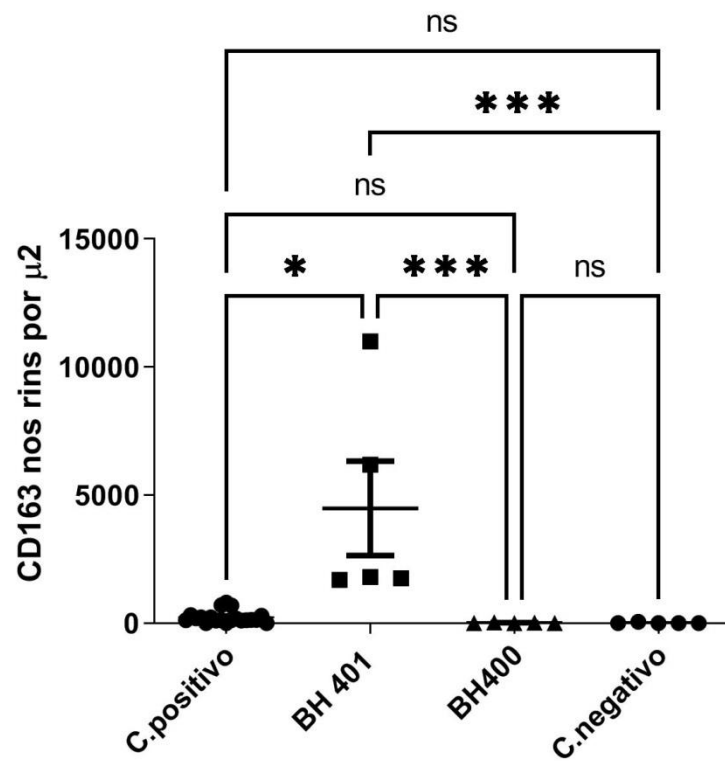


Gráfico 9: Reação imunohistoquímica para CD163 nos rins em todas as condições experimentais: Cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401 e BH 400, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo). Os resultados são exibidos como média \pm erro padrão da média, com n de 5 cães no grupo BH 401, 5 cães no grupo BH 400, 20 no grupo controle positivo e 4 no grupo controle negativo. C. positivo * $p < 0,0459$ quando comparado ao BH 401; BH 401 *** $p < 0,0005$ quando comparado ao BH 400; BH 401 *** $p < 0,0005$ quando comparado ao BH C. negativo. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

8.6 Análise do fator de crescimento tumoral beta 1 (TGF- β 1) no fígado, pulmões e rins de cães naturalmente e experimentalmente infectados

A expressão de TGF β 1 foi observada no parênquima hepático ao longo dos sinusóides (células de Küpffer), nas células que compõem os granulomas intralobulares hepáticos (Figura 8A-D). No pulmão, a expressão desse marcador se deu nos pneumócitos, nas células epiteliais dos bronquíolos terminais e sacos alveolares (Figura 8E-H). No rim, foi observada nos glomérulos e túbulos proximais e raramente nas áreas de nefrite intersticial (Figura 8 I-L).

Em todos os órgãos, os animais infectados pela cepa BH 401 apresentaram média superior de marcação em relação a ambos os grupos naturalmente infectados, ao grupo infectado pela cepa BH 400 e ao grupo controle, o mesmo ocorreu em ambos os grupos de animais naturalmente infectados em relação ao grupo BH 400 e controle negativo (Tabela 15). A expressão gênica do TGF β foi maior em cães no grupo BH401 do que nos grupos naturalmente infectados e não infectados em todos os órgãos estudados ($p < 0,099$ fígados; $p < 0,0015$ pulmões; $p < 0,08857$ e rins). O grupo controle positivo apresentou maior expressão do que o grupo de controle negativo.

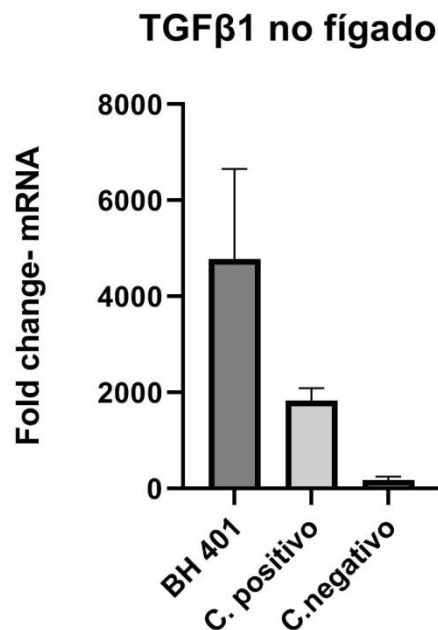


Gráfico 10: Expressão gênica do TGF β no fígado de cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo) $p < 0,099$.

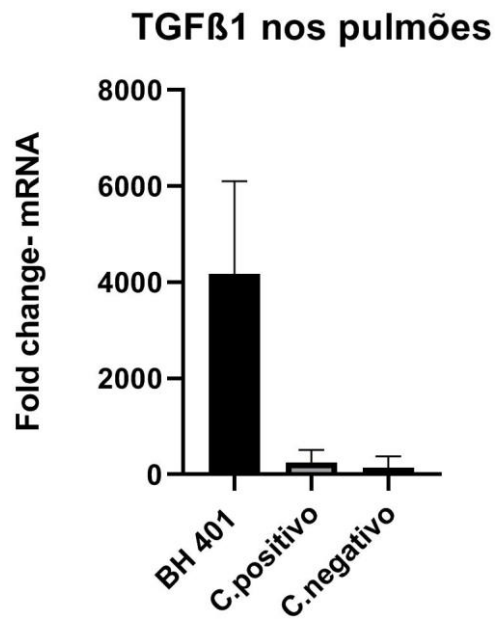


Gráfico 11: Expressão gênica do TGFβ nos pulmões de cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo) $p < 0,0015$.

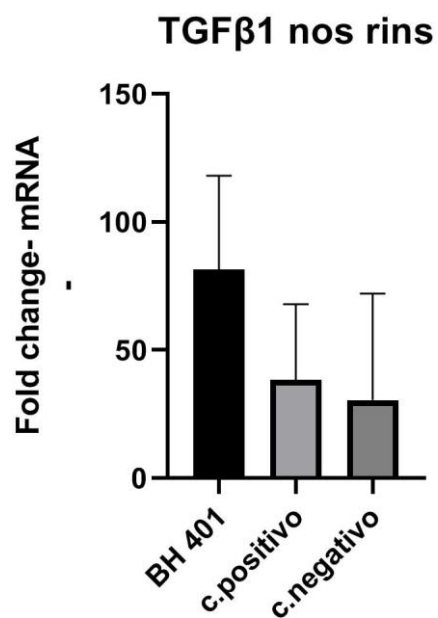


Gráfico 12: Expressão gênica do TGFβ nos rins de cães experimentalmente infectados com as cepas BH 401, cães naturalmente infectados (controle positivo), cães negativos para infecção de *L. infantum*. (controle negativo) $p < 0,08857$.

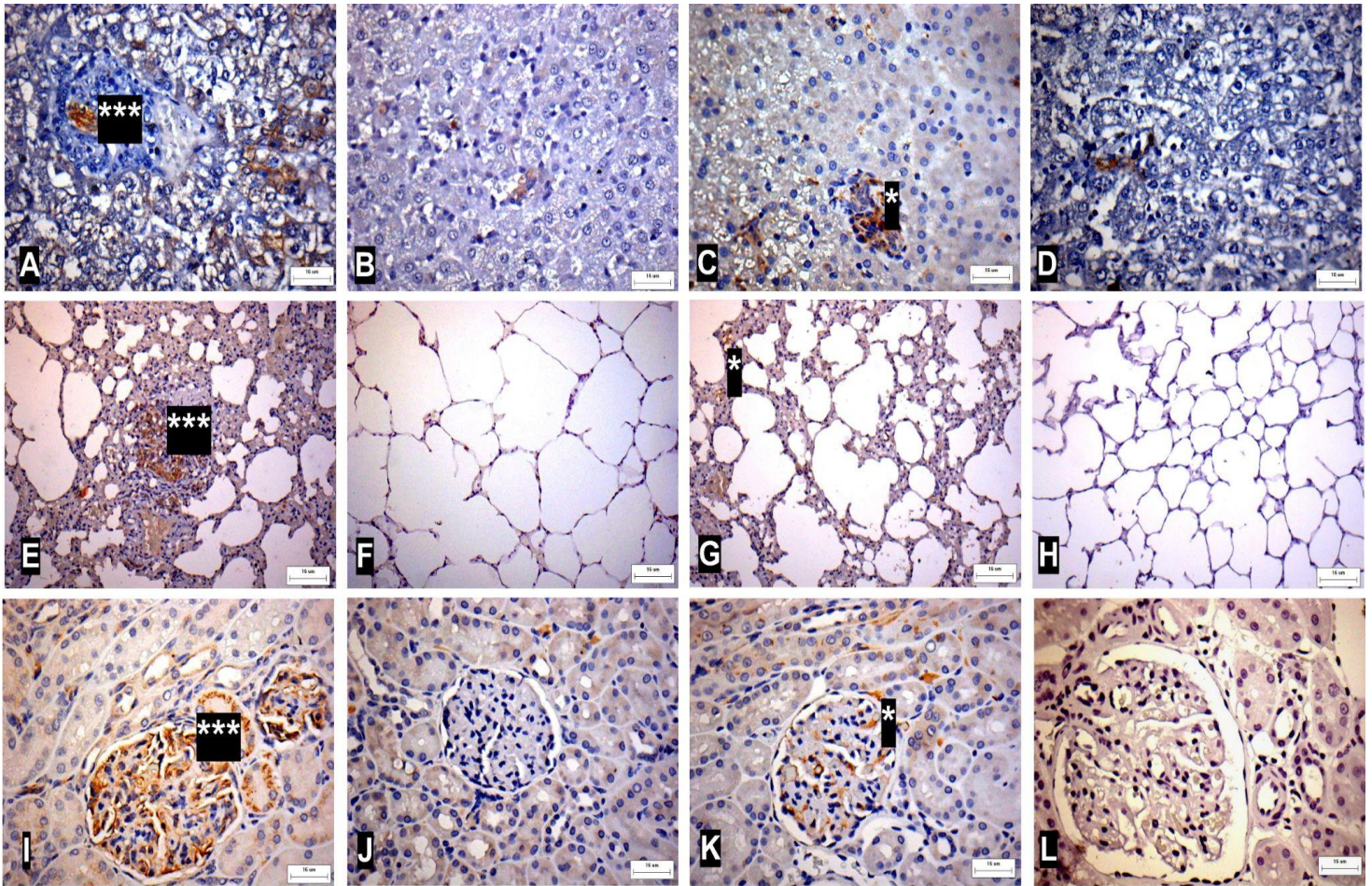


Figura 9: (A-L) Reação imunohistoquímica para TGFβ1 em secções de fígados, pulmões e rins corados em cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 μm (A-D) Fígado: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo Bh 400 (C) Grupo controle positivo (D) Grupo controle negativo. Marcação de TGFβ1 em células do granuloma intralobular, Pulmões: (E) Grupo BH 401 (F) Grupo BH 400 (G) Grupo controle positivo (H) Grupo controle negativo. *** Marcação de TGFβ1 no infiltrado inflamatório, * Marcação de TGFβ1 nos pneumócitos. (I) Rim: (I) Grupo BH 401 (J) Grupo BH 400 (K) grupo controle positivo. Marcação de TGFβ1 nos glomérulos.

8.7 Análise de α -actina de músculo liso (α -SMA), vimentina, no fígado, pulmão e rim de cães experimentalmente e naturalmente infectados

Células positivas para os antígenos α -actina de músculo liso (α -SMA) (Figura 3), vimentina (Figura 4) foram observadas distribuídas difusamente no parênquima de todos os órgãos de forma semelhante. No fígado, ou seja, nos lóbulos hepáticos, no espaço portaductos biliares, entretanto, as células endoteliais apresentaram-se negativas (Figura 3 A-D), (Figura 4 A-D). Em todo o interstício pulmonar foi possível observar a expressão desses marcadores nos pneumócitos (Figura 3 E-H), (Figura 4 E-H).

Nos rins, tiveram sua expressão nas células da região cortical na cápsula de Bowman, células epiteliais dos túbulos proximais e distais. Na camada medular dos rins as marcações foram semelhantes (Figura I-L) (Figura 4 E-H). Após análise morfométrica para todos os marcadores observou-se o mesmo padrão em todos os órgãos, de todos os indivíduos de cada grupo. Todavia, houve maior expressão nos animais do grupo BH 401 em relação ao BH 400, animais naturalmente infectados (controle positivo) e controle negativos. Já os cães do grupo controle positivo também tiveram maior expressão do que os indivíduos do grupo BH 400 e controle negativo, como se segue na tabela abaixo (Tabela 15).

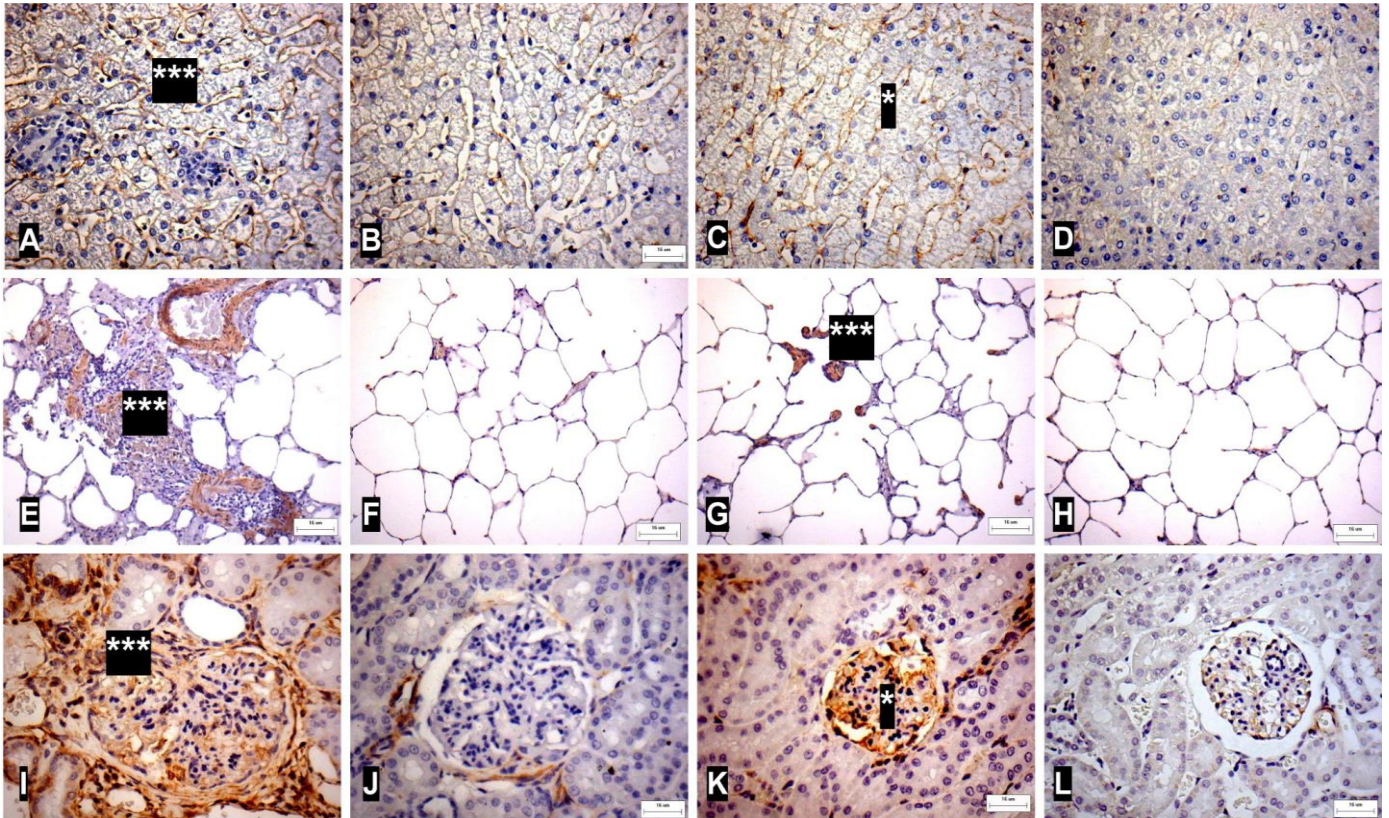


Figura 10: (A-L) Reação imunohistoquímica para α -SMA em secções de fígados, pulmões e rins corados em cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 μ m (A-D) Fígado: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo Bh 400 (C) Grupo controle positivo (D) Grupo controle negativo.* Marcação de α -SMA nos sinusóides, *Marcação de α -SMA nos sinusóides, Pulmões: (E) Grupo BH 401 (F) Grupo BH 400 (G) Grupo controle positivo (H) Grupo controle negativo. *** Marcação de α -SMA no infiltrado inflamatório, * Marcação de α -SMA nos pneumócitos. (I) Rim: (I) Grupo BH 401 (J) Grupo BH 400 (K) grupo controle positivo. Marcação de α -SMA nos glomérulos.**

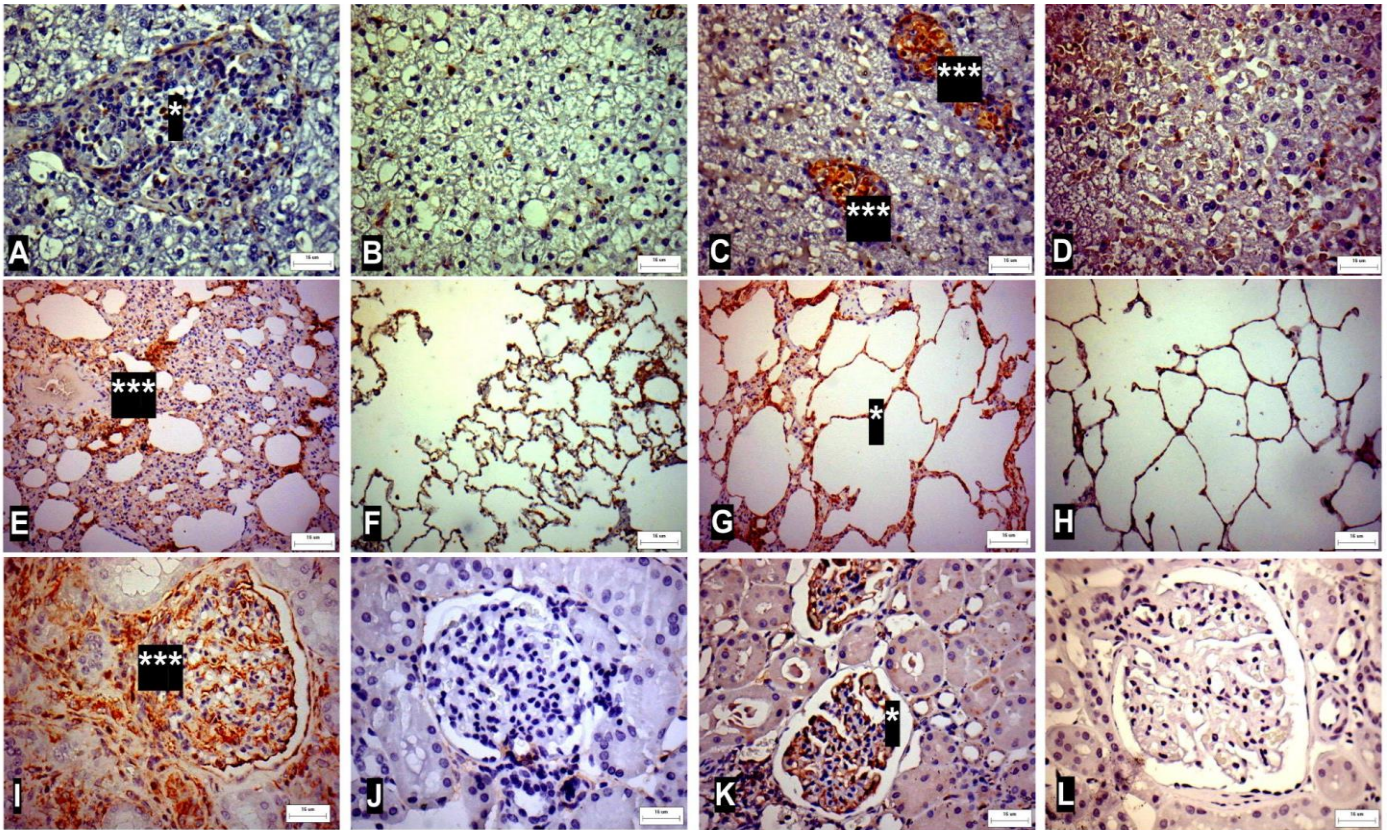


Figura 11: (A-L) Reação imunohistoquímica para vimentina em secções de fígados, pulmões e rins corados em cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 µm (A-D) Fígado: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo Bh 400 (C) Grupo controle positivo (D) Grupo controle negativo.* Marcação de vimentina em granuloma intralobular, *** Marcação de vimentina em granuloma intralobular *Marcação de vimentina sinusóides, Pulmões: (E) Grupo BH 401 (F) Grupo BH 400 (G) Grupo controle positivo (H) Grupo controle negativo. *** Marcação de vimentina no parênquima pulmonar, * Marcação de vimentina na parede alveolar. (I) Rim: (I) Grupo BH 401 (J) Grupo BH 400 (K) grupo controle positivo (L) grupo controle negativo. *** Marcação de vimentina nos glomérulos, * marcação de vimentina no glomérulo.

8.8 Análise de fibras reticulares (colágeno tipo III) no fígado de cães naturalmente e experimentalmente infectados

Após análise morfométrica da coloração de prata amoniacal de Gomori, a deposição colagenogênica no fígado, pulmão e rim observados apresentou-se intensa em todos os animais infectados principalmente naqueles que tiveram presença de um infiltrado inflamatório crônico de moderado a intenso, ou seja, nos indivíduos do grupo BH 401. Os animais naturalmente infectados sempre apresentaram médias inferiores aos do grupo BH401. Mas tiveram maior média de deposição de fibras colágenas em relação aos animais BH 400 e controle negativo (Tabela 15).

No fígado, tais fibras colágenas foram observadas no espaço porta em todo parênquima hepático de forma intensa e difusa reforçando a parede dos sinusóides. Todavia essas fibras apresentavam-se ora mais espessadas ou ora mais espiraladas distribuídas em várias direções e por vezes enclausurando grupos de hepatócitos ou hepatócitos individualmente. Esses apresentaram fibras colágenas mais delgadas e de distribuição multifocal e discreta. Nos pulmões a deposição também foi difusa nos septos alveolares acompanhando pneumonite intersticial difusa não raro, no grupo BH401 e nos cães naturalmente infectados, essas fibras reticulares mostravam-se enoveladas sustentando verdadeiras projeções dos pneumócitos hipertróficos e hiperplásicos para o espaço alveolar. Nos rins a fibrilopese ocorreu preferencialmente na camada da cortical, i de forma difusa, mas predominantemente no tufo glomerular, cápsula de Bauman e reforçando a parede dos túbulos proximais e distais (Figura 6).

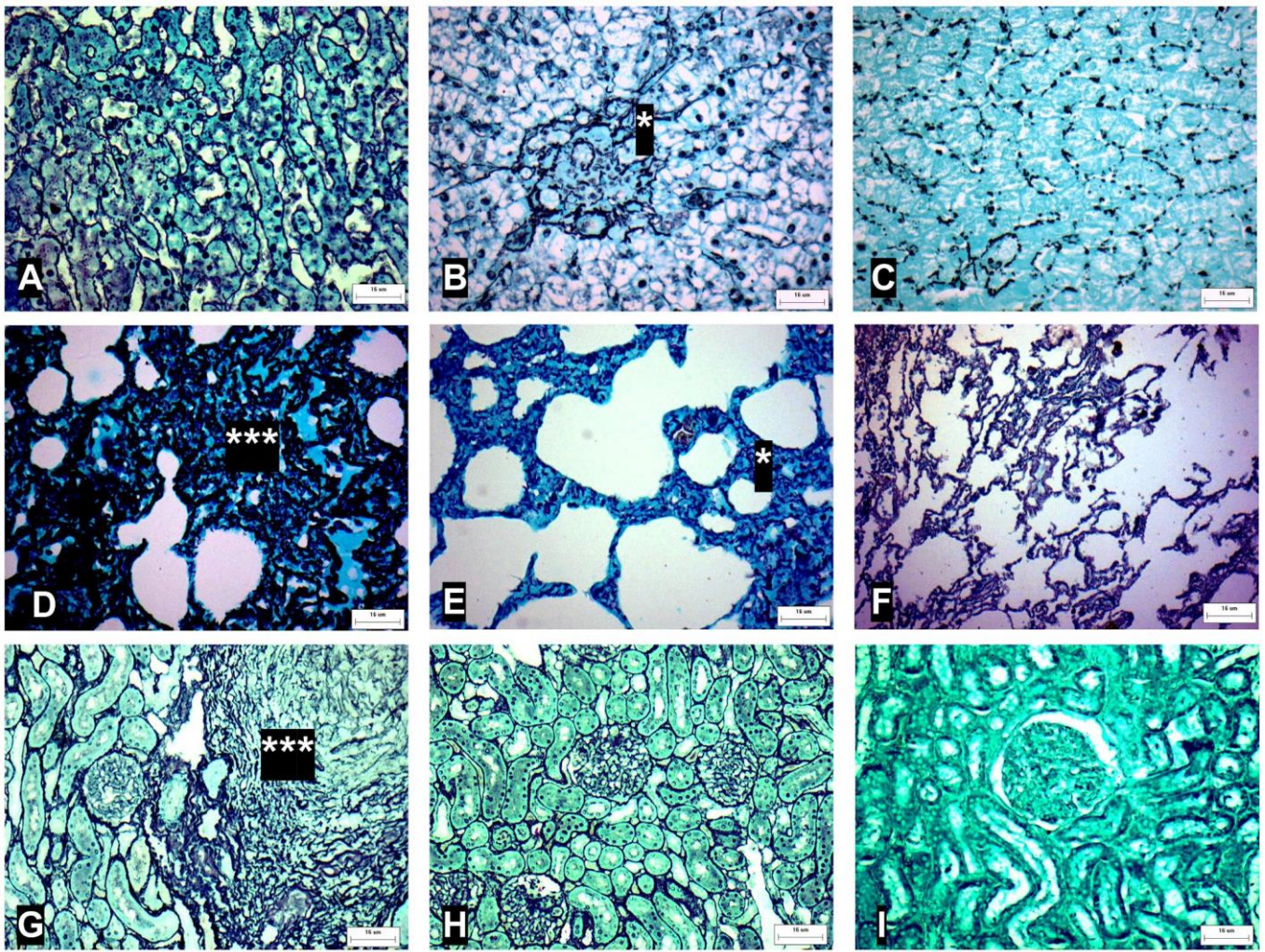


Figura 12: (A-L) Coloração de prata amoniaca de Gomori em secções de fígados, pulmões e rins corados em cães experimentalmente e naturalmente infectados com *Leishmania infantum*. barra = 16 µm (A-D) Fígado: (A) Grupo BH 401 (B) Grupo Bh 400 (C) Grupo controle positivo (D) Grupo controle negativo. * Fibras reticulares em granuloma intralobular. Pulmões: (E) Grupo BH 401 (F) Grupo BH 400 (G) Grupo controle positivo (H) Grupo controle negativo. *** Fibras reticulares no parênquima pulmonar, * Fibras reticulares na parede alveolar. (I) Rim: (I) Grupo BH 401 (J) Grupo BH 400 (K) grupo controle positivo. (L) grupo controle negativo. *** Fibras reticulares no parênquima renal

Marcação	Órgão	Área total em μm^2 (20 campos)				Valor de p *
		Controle negativo	Control positivo	Cepa BH 400	Cepa BH 401	
Colágeno	Fígado	518,45 ^a	12.729,97 ^b	1.671,87 ^{ac}	82.857,34 ^d	<0,0001
	Pulmão	76,47 ^a	9.337,15 ^b	93,65 ^{ac}	12.011,06 ^d	0,0001
	Rim	49,64 ^a	8.121,53 ^b	62,05 ^{ac}	13.767,39 ^d	<0,0001
α -SMA	Fígado	1.544,05 ^a	4.495,49 ^b	4.004,58 ^c	76.679,71 ^d	<0,0001
	Pulmão	447,73 ^a	8.789,42 ^b	1.747,91 ^{ac}	9.575,63 ^d	<0,0001
	Rim	917,00 ^a	20.900,13 ^b	1.261,26 ^{ac}	32.866,82 ^d	<0,0001
Vimentina	Fígado	1.250,53 ^a	9.303,64 ^b	3.284,45 ^{ac}	37.368,71 ^d	<0,0001
	Pulmão	481,45 ^a	8.037,52 ^b	1.276,24 ^{ac}	7.274,47 ^d	0,0001
	Rim	967,71 ^a	18.998,98 ^b	7.127,51 ^{ac}	27.828,35 ^d	<0,0001
TGF- β	Fígado	94,06 ^a	1.186,38 ^b	689,29 ^{ac}	3.201,65 ^d	<0,0001
	Pulmão	161,50 ^a	1.067,75 ^b	301,42 ^{ac}	3.688,55 ^d	<0,0001
	Rim	447,69 ^a	1.202,98 ^b	665,09 ^{ac}	2.990,48 ^d	<0,0001

* P-valor obtido a partir do teste de Kruskal Wallis, indicando a existência de pelo menos um grupo diferente dos demais; ** Valores com letras diferentes diferem pelo teste de Conover para comparações múltiplas de amostras independentes.

Tabela 15: Medianas de áreas ocupadas por colágeno, α -SMA, vimentina e TGF- β em diferentes órgãos de animais não infectados (parasitologicamente negativos para *Leishmania infantum*, ou seja, controle negativo), cães naturalmente infectados (controle positivo) e cães infectados experimentalmente com as cepas BH 400 e BH 401.

09. DISCUSSÃO

Neste trabalho realizou-se uma análise histopatológica, imuno-histoquímica e molecular da fibrilopose no fígado, pulmões e rins de cães naturalmente e experimentalmente infectados por *L. infantum*. Os resultados histológicos e imuno-histoquímicos são semelhantes ao descrito por Silva et al., 2013, Madeira et al., 2016, Castro et al., 2018, Alves et al., 2019 conforme apresentado na justificativa. Seguindo Wynn e colaboradores (2008), fibrose pode ser definida como excesso de deposição de componentes da matriz extracelular, sobretudo do colágeno (fibropoiese), sendo uma resposta fisiopatológica comum de muitos tecidos e órgãos submetidos à injúria. Assim, o objetivo principal foi o de determinar a intensidade dessa fibrilopose com intuito de se concluir ou não esse processo como realmente uma fibrose. Para isso, análises quantitativas histológicas e imunohistoquímica e ensaios moleculares foram realizados considerando-se cada cão individualmente. As densidades da fibrilopose e das expressões dos marcadores moleculares envolvidos nesse processo foram avaliados para comprovação do processo de fibrose.

O TGF β 1 (fator de crescimento transformador beta 1) é uma citocina potente que desempenha um papel impulsionador no desenvolvimento da fibrose. Essa citocina é sintetizada como um complexo de fator de crescimento que necessita de ligação com a LTBP (Proteína Ligante de Fator de Crescimento de transformação latente beta) para secreção no

espaço extracelular (Lafyatis et al., 2014). O TGF β 1 é sintetizado como um complexo de fator de crescimento de predomínio que requer ligação à LTBP para secreção eficiente no espaço extracelular (Gray & Mason, 1990).

Após a liberação, esse grande complexo latente é sequestrado por ancoragem em redes da MEC, a partir das quais o fator de crescimento maduro precisa ser ativado para atingir seus receptores e iniciar a sinalização (Ota, Kazushige, et al. 2011). Existem três isoformas diferentes dessa citocina, o TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3. Todas elas são responsáveis por estimular o crescimento da MEC e de fibroblastos, assim como pela diferenciação do fibroblasto em miofibroblastos.

Sendo que o TGF- β 1 é considerado a isoforma principal ou predominante envolvida na fibrose, entretanto o papel das isoformas TGF- β 2 e - β 3 ainda não são bem esclarecidos (Lindsay et al., 2012). Yu e colaboradores (2003) ao avaliar as três isoformas do TGF β na fibrose renal observaram que todas aumentaram a síntese e a degradação da MEC de forma similar. Em relação ao TGF β 3 não foi observado efeito anti fibrogênico, entretanto o efeito fibrogênico do TGF β 3 foi mediado pelo TGF β 1. Além disso, o TGF β 1 aumenta a síntese do TGF β 2. Em nosso trabalho a expressão gênica e proteica do TGF β 1 foram maiores no grupo BH 401 em relação aos grupos BH 400, controle positivo (animais naturalmente infectados) e controle negativo. Ao passo que no grupo controle positivo foi maior do que no grupo inoculado com a cepa BH 400 e controle negativo. Esse aumento esteve sempre associado à ocorrência de infiltrado inflamatório crônico e da deposição colagenogênica.

O desvio padrão observado na expressão gênica e na análise morfométrica do marcador imunohistoquímico pode ser justificado pela possível ação de outras isoformas do TGF β que não foram avaliadas em nosso estudo. O TGF β 1 desempenha um papel importante na progressão da leishmaniose ao suprimir a expressão de NO síntese induzível, IFN- γ e o desenvolvimento de células Th1 e Th2 (Gantt et al., 2003). Em estudos utilizando roedores, diversos autores relatam o aumento dessa citocina na infecção por *L. infantum* (Maurício et al., 1999; Rolão et al., 2003).

Alves e colaboradores (2009) ao estudar a expressão de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β em linfonodos associados à carga parasitária e forma clínica da doença em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* observaram que os linfonodos pré-escapulares de cães assintomáticos apresentaram maior expressão de IFN- γ e TNF- α e baixa carga parasitária, indicando que essas citocinas desempenham um papel na proteção contra infecção enquanto que a maior expressão de IL-10 e TGF- β e alta carga parasitária foram observadas em cães

sintomáticos, sugerindo um papel dessas citocinas na progressão da doença. Concluindo que, portanto, o equilíbrio da expressão de IFN- γ e TNF- α (protetor) e IL-10 e TGF- β (progressão da doença) em linfonodos determinam a carga parasitária e a expressão clínica em cães naturalmente infectados.

Em nossos achados, os grupos BH 401 e controle positivo, respectivamente, em comparação com o grupo BH 400 e controle negativo de fato, apresentaram maior intensidade das lesões e do parasitismo tecidual associado à expressão do TGF- β 1. Os macrófagos são as células hospedeiras finais para a proliferação dos parasitas do gênero *Leishmania*, e essas células são a chave para uma resposta controlada ou exacerbada que culmina em manifestações clínicas. M1 e M2 são os dois principais fenótipos de macrófagos. M1 é um subtipo pró-inflamatório com propriedades microbicidas, e M2, ou alternativamente ativado, é um subtipo anti-inflamatório / regulador que está relacionado à resolução da inflamação e reparo tecidual (Arango et al., 2014).

Macrófagos M1 constituem a primeira linha de defesa contra patógenos intracelulares e induzem o desenvolvimento da Resposta Th1 via secreção de IL-12 (Wang et al., 2014). A polarização de macrófagos M1 pode ser principalmente devido à presença de lipopolissacarídeo (LPS), IFN- γ ou TNF- α . O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) também pode resultar na diferenciação e manutenção do fenótipo M1 (Xu et al., 2013). Ruan e colaboradores (2015) demonstraram que a ativação do sistema complemento também está relacionada à polarização M1.

Macrófagos expressando o antígeno calprotectina (L1) vem sido descrito como uma célula de perfil M1 (Constantinescu et al., 1998; Sjölander et al., 1998). Quando avaliamos a expressão de L1 os animais do grupo BH 400 apresentaram aumento em relação aos grupos BH 401 e aos grupos controle positivo e negativo. Esse aumento correlaciona-se com ausência de lesões significativas no grupo BH 400. A classificação dos macrófagos M2 subdivide-se em quatro subtipos, M2a, M2b, M2c e M2d, de acordo com o estímulo e função (Zanluqui et al., 2015).

Macrófagos M2 estão associados com a produção de IL10, TGF- β , CXCL13, CCL16 e CCL18, o que leva à regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e um aumento no recrutamento de eosinófilos e células T virgens. As células M2c expressam altos níveis de arg-1, CD163, CD206, TLR1, TLR8, FPR1, CCR2, CCR5 e CD163. Silva e colaboradores (2018) demonstrou que a molécula CD163 foi associada ao fenótipo M2, e pode ser usado como um biomarcador de parâmetros de gravidade da VLH. Em nosso estudo os animais

inoculados com a cepa BH 401 apresentaram maior expressão desse marcador em relação ao grupo BH 400 e aos grupos controle positivo e negativo, associado a maior carga parasitária tecidual e maior intensidade das lesões.

Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade dos promastigotas interagirem com colágeno I, indicando a presença de um receptor de superfície do parasita (Lira et al., 1997). Nos estudos de Petrópolis DB. et al, 2014 invasão do parasita nas estruturas 3D do colágeno I levou à remodelação do colágeno (degradação de cerca de 20%), possivelmente mediada por metaloproteinases.

Essas observações podem indicar que os promastigotas precisam secretar proteases para quebrar estruturas de colágeno rígidas para facilitar a migração no hospedeiro antes de serem internalizadas por uma célula hospedeira. Curiosamente, ocorre uma “mudança” de colágeno durante a infecção experimental com *Leishmania*: o colágeno I observado nos estágios iniciais é substituído pelo colágeno III durante a fase crônica da infecção (Cardoso et al., 2020).

O grupo BH 401 foi o grupo com maior deposição de colágeno III, seguido do grupo controle positivo em relação ao grupo BH 400 e controle negativo, em nosso estudo. Madeira e colaboradores (2016), estudando a fibrilopose hepática em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, relataram uma correlação positiva entre a fibrilopose e a expressão de marcadores mesenquimais como a α -SMA, citoqueratina, e a citocina TGF- β 1. Diferentemente do que foi encontrado por Madeira e colaboradores (2016), neste estudo, observou-se correlação entre a fibrilopose e outro marcador mesenquimal adicional: a vimentina. Além disso, avaliamos a presença desses mesmos marcadores nos pulmões e nos rins onde a mesma correlação com a fibrilopose ocorreu.

Alves e colaboradores (2019) observaram nos rins de cães naturalmente infectados e experimentalmente infectados com a cepa MCAN/BR/2002/BH401 o mesmo aumento de TGF β 1, α -SMA e vimentina associado à deposição de colágeno III que observamos em nossos resultados. Silva e colaboradores (2013) avaliaram o fígado, baço, rim, pulmão e linfonodos de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, relatando o aumento da deposição de colágeno III nesses órgãos, evidenciando um caráter fibrosante da LVC. Então, esses autores chamaram a atenção do caráter sistêmico da fibrilopose propondo o cão como modelo de doença fibrosante na LVC. A análise da fibrilopose, neste trabalho, confirma os achados anteriormente descritos na literatura, mas agora com uma ressalva importante: os indivíduos dos grupos BH 401 apresentaram tanto maior aumento de fibras reticulares tanto

quanto de um infiltrado inflamatório granulomatoso intenso. Isso também ocorreu nos órgãos dos cães dos outros grupos de animais infectados, e sempre acompanhado de uma maior carga parasitária.

No grupo de animais negativos para a infecção, a fibrose foi discreta e quase inexistente em todos os órgãos. Esses resultados são importantes, pois são poucos os trabalhos na literatura que fazem descrições sistêmicas de lesões anatomopatológicas de cães experimentalmente infectados por *L.infantum* ou mesmo *L.donovani*. De acordo com a literatura cães são excelentes modelos para estudos da leishmaniose visceral humana, pois desenvolvem aspectos clínicos e anatomopatológicos semelhantes (Verres et al., 1977; Abranches et al., 1991; Alvar et al., 2004).

De acordo com Moreno & Alvar (2002), os estudos das infecções experimentais caninas enfrentam desafios importantes como a variabilidade da resposta de cada animal, isto é, um mesmo inóculo preparado para um determinado grupo de cães pode promover diferentes formas clínicas da doença. Portanto, alguns animais podem desenvolver a doença manifesta (sintomáticos), outros podem permanecer assintomáticos (infectados saudáveis) ou apresentarem sinais clínicos transientes ou mesmo com cura espontânea evidenciando resistência natural (Solano-Gallego et al., 2000; Martínez-Orellana et al., 2017).

Dentro dessa ideia há um consenso na literatura de que a resposta imune celular iniciada por protozoários do gênero *Leishmania* seria fundamental para a remissão da infecção (Pinnelli et al., 1994; Morenno & Alvar, 2002).

Cães naturalmente infectados em áreas endêmicas, apesar de na sua maioria serem infectados saudáveis (Solano-Gallego et al., 2011), estão expostos a vários outros fatores que interferem nas respostas imunes humorais ou adaptativas e conseqüentemente na patogênese da doença (Portella-Áquila et al., 2018). Então a busca de protocolos experimentais caninos que reproduzam aspectos clínicos, imunológicos e anatomopatológicos de forma homogênea ao longo da infecção é uma realidade e esforço de vários grupos de pesquisa.

Alguns fatores, por exemplo, que desafiam esses protocolos são: (1) diferentes doses e vias do inóculo com a presença ou não da saliva do inseto; (2) fases e virulência dos parasitos do gênero *Leishmania* (promastigotas e amastigotas) mantidas em laboratório “in vitro” e “in vivo”; (3) raça dos animais (Morenno & Alvar, 2002). Diferentes vias de inoculação como a via intravenosa, subcutânea e intradérmica são empregadas nos diferentes trabalhos consultados na literatura. Porém, a via intravenosa parece ser mesmo a preferencial, pois seria a melhor maneira de se obter cães sintomáticos em um período pré-patente mais curto e

também tornando os ensaios clínicos mais viáveis economicamente (Soutter et al. 2018; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Poot et al., 2005).

Como discutido por Abbehusen e colaboradores (2017) a via ideal e mais natural possível seria a intradérmica por meio do uso de insetos vetores (flebotomíneos), mas isso infere em manter uma robusta colônia de flebotomíneos em laboratório o que muitas vezes é inviável. Além disso, de acordo com esses autores e também outros, como Paranhos-Silva e colaboradores (2003) e Costa e colaboradores (2003), a saliva dos flebotomíneos não parece potencializar ou modular o curso da infecção experimental de forma significativa nos cães. Infecções com formas amastigotas ou promastigotas de *Leishmania* parecem não interferir muito no curso da infecção quando se considera a via intravenosa.

De fato, taxas médias de 86% de infecção são descritas utilizando formas amastigotas de *Leishmania* (Abranches et al., 1991, Campino et al., 2000; Leandro et al., 2001; Oliveira et al., 1993; Rhallen et al., 1999) muito semelhantes às taxas médias de infecção de 90% quando se utiliza as formas promastigotas (Abranches et al., 1991; Martinez-Moreno et al., 1995, Nieto et al., 1999, Riera et al., 1999). Doses de inóculo de 5×10^7 formas promastigotas de *Leishmania*, por via endovenosa, promovem 100% de sucesso para a infecção experimental em cães da raça Beagle de acordo com vários autores (Moreno et al. 1993; Valladares et al., 1998; Poot et al., 2005; Rodriguez-Cortés et al., 2007). Protocolo semelhante foi realizado neste trabalho. Então, considerando a literatura consultada, protocolos para desenvolvimento da LVC experimental não exploram a anatomia-patológica em detalhes, muito menos os aspectos da LVC como modelo de doença fibrosante (George, et al., 1976; Marcussen, et al., 1989; Nieto et al., 1992; Costa, et al., 2000 e 2003; Aresu et al., 2007; Costa, et al., 2010; Fernandez-Costa et al., 2013; Hernandez et al., 2015). Assim, a cepa BH401 foi a que causou lesões clássicas da leishmaniose visceral. Apesar de não descritos ou representados aqui, análises histológicas, parasitológicas e imunohistoquímica, desses vários órgãos, como o baço, linfonodos cervicais, medula óssea costal, pele e todo o tubo gastrointestinal (TGI) foram realizados.

As lesões clássicas podem ser assim descritas: (1) Baço: esplenite capsular crônica com hipertrofia da polpa vermelha caracterizada pela intensa proliferação de macrófagos além da presença de inúmeros plasmócitos. Presença de granulomas na polpa vermelha constituídos principalmente por células epitelióides e macrófagos repletos de formas amastigotas no seu interior. Atrofia da polpa branca em especial na região periarteriolar. Exuberância do sistema trabecular da polpa vermelha e espessamento notável da cápsula; (2) Linfonodos: linfadenite

capsular crônica com notável espessamento, hipertrofia e hiperplasia dos cordões e seios medulares com infiltrado inflamatório rico em plasmócitos e macrófagos, esses repletos de formas amastigotas no seu interior. Reatividade dos centros germinativos da região cortical; (3) Medula óssea: hipertrofia e hiperplasia das trabéculas ósseas além e de células de origem mieloide, presença da fibrose em células da linhagem mieloide; (4) Pele, inflamação crônica não granulomatosa difusa nas camadas papilar e reticular da derme e focal ao redor de vasos e anexos da epiderme; (5) TGI, hipertrofia e hiperplasia das células da lâmina própria (macrófagos e plasmócitos, principalmente) a partir do estômago até o reto. Parasitismo intenso especialmente no cólon e reto de todos os animais.

Nossos resultados demonstraram que a expressão gênica de TGF- β em cães infectados com a cepa BH 401 foi exuberante em relação ao grupo controle positivo, e foi acompanhada por deposição de colágeno, α -SMA, vimentina e citocina TGF- β 1. Seria interessante investigar outros genes, incluindo PDGF, TIMP e metaloproteinases para determinar os mecanismos moleculares da fibrose canina na leishmaniose visceral de cães infectados experimentalmente e naturalmente.

10. CONCLUSÃO

A fibrose foi um achado comum no fígado, pulmão e rim de todos animais infectados, tanto experimentalmente quanto naturalmente infectados sendo que a cepa BH 401 apresenta intensa patogenia ao gerar fibrose de forma sistêmica.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEHUSEN, M. M. et al. **Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs.** 2017. Scientific Reports. 7(1):15914. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15651-8>.

ABRANCHES, P. et al. **An experimental model for canine visceral leishmaniasis.** 1991. Parasite Immunology. 13(5): 537-550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1991.tb00550.x>.

ALEXANDER, J., SATOSKAR, A. R., RUSSELL, D. G. **Leishmania species: models of intracellular parasitism.** 1999. Journal of Cell Science. 112.18: 2993-3002. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10462516>.

ALVAR, J. et al. **Advances in parasitology.** 2004. 57: 1-88. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X).

ALVES, A. F. et al. **Immunohistochemical study of renal fibropoiesis associated with dogs naturally and experimentally infected with two different strains of leishmania (*L. infantum*).** 2019. International Journal of Experimental Pathology. 100 (4): 222-233. <https://doi.org/10.1111/iep.12321>.

ALVES C. F. et al. **Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*.** 2009. Veterinary immunology and immunopathology. 128(4): 349-358. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.020>.

AKHOUNDI, M., et al. **A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies.** 2016. PLOS Neglected Tropical Diseases. 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004770>.

AKHOUNDI, M. et al. **Leishmania infections: molecular targets and diagnosis.** 2017. Molecular Aspects of Medicine. v. 57, p. 1-29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>.

ARANGO D. G., DESCOTEAUX A. **Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases.** 2014. *Frontiers in immunology.* 5(491).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>.

ARESU, L. et al. **Epithelial–mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells in canine glomerulonephritis.** 2007. *Virchows Archiv.* 451.5: 937-942.

<https://doi.org/10.1007/s00428-007-0482-8>.

BESTEIRO, S. et al. **Protein turnover and differentiation in Leishmania.** 2007. *International journal for parasitology.* 37.10: 1063-1075.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.008>.

BHATTACHARYA, A., BISWAS, A., DAS, P. K. **Identification of a protein kinase A regulatory subunit from Leishmania having importance in metacyclogenesis through induction of autophagy.** 2012. *Molecular Microbiology.* 83.3: 548-564.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07950.x>.

BISWAS, J. et al. **Impacts of ecotourism on bat habitats in caves of Kanger Valley National Park, India.** 2011. *Research Journal of Environmental Sciences.* 5: 752-762.

<http://doi.org/10.3923/rjes.2011.752.762>.

BUECHLER, C. et al. **Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro-and antiinflammatory stimuli.** 2000. *Journal of Leukocyte Biology.* 67.1: 97-103. <http://doi/pdf/10.1002/jlb.67.1.97>.

CAMPINO, L. et. al. **Infectivity of promastigotes and amastigotes of Leishmania infantum in a canine model for leishmaniosis.** 2000. *Veterinary Parasitology.* 92:269-75.

[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00313-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00313-7).

CARDOSO F. O. et al. **Modulation of cytokines and extracellular matrix proteins expression by Leishmania amazonensis in susceptible and resistant mice.** 1986. *Frontiers in microbiology.* 11(2020). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01986>.

- CASTRO, R. S., et al. **Hepatic fibropoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* treated with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol.** 2018. *Veterinary Parasitology*. 250: 22-29.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.005>.
- COSTA D. J., et al. **Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis.** 2013. *PLoS ONE*. 8(4): e60535.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060535>.
- COSTA, F. A. et al. **CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis.** 2000. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33(12): 1455-1458. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2000001200009>.
- COSTA, F. A. et al. **Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis.** 2003. *Veterinary Pathology*. 40(6):677-684. <https://doi.org/10.1354/vp.40-6-677>.
- COSTA F. A., et al. **T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis.** 2010. *BMC Infectious Diseases*. 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-112>.
- COSTA, M. M. S. et. al. **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.** 2008. *Veterinary Pathology*. V. 45: 613-6. <https://doi.org/10.1354/vp.45-5-613>.
- CONSTANTINESCU, C. S. et al. **The role of IL-12 in the maintenance of an established Th1 immune response in experimental leishmaniasis.** 1998. *European Journal of Immunology*. 28.7: 2227-2233. <https://doi.org/10.1002/>.
- DANTAS-TORRES, F. **Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco.** 2006. *Revista de Saúde Pública*. São Paulo, v.40, n.3, p.537-541.
<https://doi.org/10.1590/S0034-89102006000300024>.

DA SILVA, S. M. et al. **Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis.** 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 56.6: 2858-2867.

<https://doi/10.1128/AAC.00208-12>.

DEANE, L. M., DEANE, M. P. **Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission.** 1962. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 4(3): 198-212.

DI RIENZO J. A. et al. **InfoStat Version.** 2015. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. pp. 2015. <http://www.infostat.com.ar>.

FERNANDES, A. P. et al. **Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein.** 2008. *Vaccine*. v. 26, n. 46, p. 5888-5895. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.095>.

FIGUEIREDO, F. B. et al. **Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina.** 2012. *Acta Scientiae Veterinariae*. 40.1:1026, 1-4. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289021814017>.

FIGUEIREDO, M. M. et al. **Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*.** 2013. *BMC immunology*. 14.1: 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-22>.

FISCHER, K. R. et al. **Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance.** 2015. *Nature*. 527, 472-476. <https://doi.org/10.1038/nature15748>.

FOX J., WEISBERG S. **An R companion to applied regression.** 2018. Sage publications.

GANTT K. R. **Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages.** 2003. *The Journal of Immunology*. 170(5): 2613-2620. <https://10.4049/jimmunol.170.5.2613>.

GEORGE, J. W. et al. **Canine leishmaniasis with amyloidosis**. 1976. *Veterinary Pathology*. v. 13, n. 5, p. 365-73. <https://doi.org/10.1177/030098587601300506>.

GEURTS, N., OPDENAKKER, G., VAN DEN STEEN, P. E. **Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections**. 2012. *Pharmacology and Therapeutics*. v. 133, n. 3, p. 257-279. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.11.008>.

GONÇALVES, R. et al. **Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi: a histopathological and morphometric study**. 2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45.3:153-158. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000300007>.

GOULART, I. M. B., PENNA, G. O., CUNHA, G. **Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to Mycobacterium leprae**. 2002. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35 (4). <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000400014>.

GRAY A. M., MASON A. J. **Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly**. 1990. *Science (New York, N. Y.)*. 247(4948):1328-1330. <https://doi.org/10.1126/science.2315700>.

HERNÁNDEZ L., et al. **Course of experimental infection of canine leishmaniasis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques**. 2015. *Veterinary Parasitology*. 207(1-2): 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.035>.

KANE, M. M., MOSSER, D. M. **The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis**. 2001. *The Journal of Immunology*. 166.2: 1141- 1147. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1141>.

KEELEY, E. C., MEHRAD, B., STRIETER, R. M. **Fibrocytes: bringing new insights into mechanisms of inflammation and fibrosis**. 2010. *The international journal of biochemistry and Cell Biology*. 2 42.4: 535-542. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.10.014>.

KEENAN C. M., et al. **Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog.** 1984. II. Pathology. Veterinary Pathology. 21(1): 80-86. <https://doi.org/10.1177/030098588402100114>.

KILLICK-KENDRICK, R. **The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host.** 1990. Annales de Parasitologie humaine et comparée. 65: 37-42. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990651037>.

LAFYATIS R. **Transforming growth factor β --at the center of systemic sclerosis.** 2014. Nature Reviews, Rheumatology. 10(12): 706–719. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.137>.

LAINSON, R., RANGEL, E. F. **Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review.** 2005. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100.8: 811-827. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>.

LEANDRO, C. et al. **Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis.** 2001. Veterinary Immunology and Immunopathology. v. 79, n. 3-4, p. 273-284. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00270-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00270-7).

LIMA W. G. et al. **Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes.** 2004. Acta Trop. 92(1): 43-53. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2004.04.007>.

LINDSAY M. E. et al. **Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm.** 2012. Nature genetics. 44(8): 922-927. <https://doi.org/10.1038/ng.2349>.

LIRA R., ROSALES-ENCINA J. L., ARGUELLO C. **Leishmania Mexicana: binding of promastigotes to type I collagen.** 1997. Experimental parasitology, 85: 2, 149-157. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.4127>.

MADEIRA, I. M. et al. **Immunohistochemical study of hepatic fibropoiesis associated with canine visceral leishmaniasis.** 2016. *International Journal of Experimental Pathology*. 97(2):139-149. <https://doi.org/10.1111/iep.12179>.

MANCIANTI, F. et al. **Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment.** 1988. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 82.4: 566-567. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(88\)90510-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90510-X).

MANSOUR N. S. et al. **A Modified Liquid Medium for Leishmania.** 1973. *The Journal of Parasitology*. 59(6): 1088-1090. <https://doi.org/10.2307/3278648>.

MARCUSSEN, N., VETNER, N., KRISTENSEN, H. M. **Interstitial nephritis and glomerulonephritis in visceral leishmaniasis in a dog.** A case reports. *APMIS*, 97:1137-1140.1989. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1989.tb00529.x>.

MARTÍNEZ-MORENO, A. et al. **Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis.** 1995. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 48(3-4): 209-220. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05434-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05434-8).

MARTÍNEZ-ORELLANA, P. et al. **Leishmania infantum-specific IFN- γ production in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis at diagnosis and during treatment.** 2017. *Veterinary parasitology*. 248: 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.018>.

MAURICIO I. L. et al. **Genomic diversity in the Leishmania donovani complex.** 1999. *Parasitology*. 119(3): 237-246. <https://doi.org/10.17037/PUBS.00682281>.

MELO, F. et al. **Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with leishmania (*leishmania*) *chagasi*.** 2008. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79(2): 198-204. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.198>.

MELO, F. A. et al. **Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2009. International Journal of Experimental Pathology. 90(5): 538-548. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00681.x>.

MENDES, R. S. et al. **Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: aspectos clínicos e patológicos**. 2011. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 66.1:79-84. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352014000100012>.

MENDIBURU F. D. **Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research**. 2015. R Package Version 1.2-3. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância Epidemiológica, 2010. <https://www.gov.br/saude/pt-br>.

MORENO, J., ALVAR, J. **Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model**. 2002. Trends in Parasitology. 18 (9): 399-405. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02347-4).

MOSSER, D. M., EDELSON, P. J. **The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes**. 1985. The Journal of Immunology. 135.4: 2785-2789. <https://www.jimmunol.org/content/135/4/2785.long>.

MOSSER, D. M., EDWARDS, J. P. **Exploring the full spectrum of macrophage activation**. 2008. Nature Reviews Immunology. 8(12): 958-969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.

NASCIMENTO, P. R. P. **O papel modulatório do ferro sobre a resposta imune na Leishmaniose Visceral**. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2012.

NIETO, C. G. et al. **Pathological changes in kidneys of dogs with natural Leishmania infection.** 1992. *Veterinary Parasitology*. 45(1-2): 33-47. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90025-5](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90025-5).

NIETO C. G. et al. **Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of Leishmania infantum: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis.** 1999. *Veterinary immunology and immunopathology*. 67(2):117-130. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(98\)00213-x](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(98)00213-x).

OLIVEIRA, G. G. S., SANTORO F., SADIGURSKY M. **The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs.** 1993. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, 88: 243-248. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761993000200011>.

OLIVEIRA, J. M. et al. **Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais.** 2010. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 43, p. 188-193. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000200016>.

OLIVEIRA NETO, M. P. et al. **Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by Leishmania donovani chagasi.** 1986. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81.3: 303-309. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761986000300006>.

PARANHOS-SILVA M, et al. **A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with Leishmania chagasi in the presence or absence of sand fly saliva.** 2003. *Veterinary Parasitology*. 114(2): 97-111. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(03\)00132-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00132-8).

PASTORINO, A. C. et al. **Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais.** 2002. *Jornal de Pediatria*. v. 78, n. 2, p. 120-7. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572002000200010>.

PINELLI, E. et al. **Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum.** 1994. *Infection and immunity*, v. 62, n. 1, p. 229-235. <https://doi.org/10.1128/iai.62.1.229-235.1994>.

PINTO, A. J. W. et al. **Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with Leishmania infantum.** 2011. *Acta Veterinaria*

Scandinavica. 53.1: 67. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-67>.

POHLERT T. **The Pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR)**. 2014. R package. <http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>.

POOT, J, et al. **Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs**. 2005. Veterinary Parasitology. 130 (1-2): 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.002>.

PORTELA, A. S. B. et al. **Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis**. 2018. Immunobiology, 223.3: 303-309. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.043>.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. 2020. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. 2020: 201. <http://www.R-project.org/>.

RHALEM, A. et al. **Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum***. 1999. Veterinary Parasitology. 81(3): 173-184. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00240-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00240-4).

RIERA, C. et al. **Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate**. 1999. Veterinary Parasitology. 84(1-2): 33-47. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00084-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00084-9).

RODRÍGUEZ-CORTÉS A. et al. **A long-term experimental study of canine visceral leishmaniasis**. 2007. International Journal for Parasitology. 37(6): 683-693. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.007>.

ROLÃO N. et al. ***Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice**. 2007. Experimental parasitology. 115 (3): 270-276. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.09.013>.

RUAN C-C., et al. **Complement-mediated macrophage polarization in perivascular adipose tissue contributes to vascular injury in deoxycorticosterone acetate–salt mice.** 2015. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 35(3): 598-606. [https://doi:10.1161/ATVBAHA.114.304927](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304927).

SANTOS-GOMES G. M. et al. **Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*.** 2002. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 88(1-2): 21-30. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(02\)00134-4](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00134-4).

SAÚDE.ORG. Brasil: **Ministério da Saúde.** 2018. Acesso em 10/10/2019. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>.

SEVÁ, A. P. et al. **Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil.** 2016. *Plos One.* v. 11, n. 7, p. e0160058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160058>.

SILVA, C. M. H. S., WINCK, C. A. **Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura.** 2018. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde.*16.1. <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v16i1.3383>.

SILVA, L. C. et al. **Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease.** 2013. *International Journal of Experimental Pathology,* v. 94, n. 2, p. 133-143. <https://doi.org/10.1111/iep.12010>.

SJÖLANDER, A. et al. **Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis.** 1998. *Journal Immunol.* 160(8): 3949-3957. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9558102>.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. **The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection.** 2000. *Veterinary Parasitology,* 90.1-2: 37-45. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00223-5).

SOLANO-GALLEGO L. et al. **LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis**. 2011. *Parasites & vectors*. 4(1): 1-16. <https://10.1186/1756-3305-4-86>.

SONG, W., JACKSON, K., MCGUIRE, P. G. **Degradation of type IV collagen by matrix metalloproteinases is an important step in the epithelial-mesenchymal transformation of the endocardial cushions**. 2000. *Developmental Biology*. v. 227, n. 2, p. 606-617. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9919>.

SOUTTER, F. et al. **Inconsistent MHC class II association in Beagles experimentally infected with *Leishmania infantum***. 2018. *The Veterinary Journal*. 235:9-15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.03.001>

SOUZA, C. C. et al. **A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis**. 2014. *International Journal Experimental Pathology*. 95(4):260-270. <https://doi.org/10.1111/iep.12080>.

TAFURI, W. L. et al. **Estudo, ao microscópio óptico e eletrônico, do rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 1989. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 31.3:139-145. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651989000300002>.

TAFURI, W. L. et al. **Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 1996. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 38(2): 81-89. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651996000200001>.

TAFURI, W. L. et al. **Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil**. 2001. *Veterinary Parasitology*. 96(3): 203-212. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00436-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00436-2).

TAFURI W. L., et al. **An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues**. 2004. *Journal of immunological methods* 292.1-2:17-23. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.05.009>.

VALLADARES, J. E. et al. **Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum***. 1998. *Veterinary Parasitology*. 75(1): 33-40. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(97\)00193-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00193-3).

VERESS, B. et al. **Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis**. 1977. *Immunology*. 33(5): 605-610. PMID: 590992; PMC: 1445510.

WANG N., LIANG H., ZEN K. **Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance**. 2014. *Frontiers in immunology*. 5: 614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>.

WYNN, T. A. **Cellular and molecular mechanisms of fibrosis**. 2008. *The Journal of Pathology*. 214(2): 199-210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>.

WYNN, T. A. **Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm**. 2004. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, n. 8, p. 583-594. [Doi: 10.1038/nri1412](https://doi.org/10.1038/nri1412).

XAVIER, S. C. et al. **Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil**. 2006. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 58.6: 944-1000. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000600004>.

Xu W. et al. **Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages**. 2013. *Molecular Immunology*. 53(3): 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.07.005>.

XUE, M., NGHIA, T. V. L., JACKSON, C. J. **Targeting matrix metalloproteases to improve cutaneous wound healing**. 2006. *Expert opinion on therapeutic targets*, v. 10, n. 1, p. 143-155. <https://doi.org/10.1517/14728222.10.1.143>.

YU LING et al. **TGF- β isoforms in renal fibrogenesis**. 2003. *Kidney international*. 64(3): 844-856. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00162.x>.

ZANLUQUI, N. G., WOWK P. F., PINGE-FILHO P. **Macrophage polarization in Chagas Disease**. 2015. Journal of Clinical & Cellular Immunology. 6(2):1-6. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000317>.

ZEISBERG, E. M. et al. **Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis**. 2007. Nature Medicine. 13.8:952. <https://doi.org/10.1038/nm1613>.