

ALDAIR JUNIO WOYAMES PINTO

Estudo histológico e parasitológico do trato gastrintestinal de
cães infectados com
Leishmania (Leishmania) chagasi.

**Belo Horizonte
2011**

ALDAIR JUNIO WOYAMES PINTO

Estudo histológico e parasitológico do trato gastrintestinal de
cães infectados com
Leishmania (Leishmania) chagasi.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri
Departamento de Patologia Geral ICB/UFMG

Co-Orientador: Prof. Marcelo Vidigal Caliari
Departamento de Patologia Geral ICB/UFMG

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina/UFMG

2011

Dedico não só esta, mas todas
as minhas conquistas a
Artur Gandra Woyames Pinto e a
Renata Gandra Sales.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Pai amigo Bondoso que sempre me olha sorrindo quando pela manhã, agradeço por mais um dia de vida dos que amo.

Ao Prof. Wagner Luiz Tafuri, que desde quando cheguei ao LPL (antigo NIPE), me proporcionou todas as conquistas, que nunca fechou portas para mim dentro da universidade, somente as abriu e deixou que eu pudesse chegar aonde cheguei, e contrariar o que muitos não acreditavam.

Ao Prof. Ricardo que me incentivou mesmo nos tempos de Faculdade (FEAD) a explorar novos rumos, e conhecer o mundo maravilhoso da pesquisa científica.

Ao Prof. Marcelo, exemplo de serenidade, organização e orientação para qualquer aluno.

Ao Prof. Hélio Chiarini Garcia que sempre muito gentil, me atendeu e orientou quando preciso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia/UFMG, por me proporcionar um programa de qualidade incontestável e de grande enriquecimento científico.

Aos “Gentálias” do Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL), Belinha, Marta, Carol, Rodrigo, Igor, Lucélia 1, Lucélia 2, Daniel Morcegão, Vitor, Jaqueline, Marcela, Teté por serem além de colegas de trabalhos, amigos que nos movem para frente, sempre.

Aos colegas como Wanderson, Eliane, Ferdinan, Everton (*in memorian*) do LPL.

A Belinha além de uma grande pesquisadora uma mulher de determinação e do coração que cabe o mundo, pesquisadora que hora nenhuma hesitou em ajudar.

À Martinha, “mãe” de todos os alunos que sempre ajudou sem medir esforços.

A Clínica Veterinária Padre Eustáquio representada pelos colegas Dr.Rodrigo, Dr.Richer, Dr. Diogo, Dr. Adriana, Dona Rosângela, Ulisses, Léo, Meire, Andréia, Lua, sempre um sorriso e uma alegria em meus dias de veterinário clínico.

Ao amigo e professor Thiago Martins por me ensinar tudo o que sei na prática médica de pequenos animais.

Aos sempre mestres, professores da FEAD e amigos de Trabalho Prof. Paulo Gabriel, Profa. Elaine, Profa. Ronize, Profa Simone, Prof. Breno, Prof.João Carlos.

As técnicas Mirna, Olinda, Vânia pela ajuda contínua.

Ao Sr. Elmo José que cuida de cães como ninguém

Ao meu Pai (*in memoriam*) que me ensinou e deu sentido aos termos respeito, amor, trabalho, amigo, hombridade.

À minha mãe que não me deixou ser músico, e escolheu para mim a veterinária, me proporcionando muito do que tenho hoje.

A Renata e Artur minhas células marca-passo que despolarizam minhas membranas celulares conduzindo a carga elétrica para mover tudo o que eu sou.

Ao tio Davi que me ensinou o que escola nenhuma ensina.

A minha família, maravilhosa e alegre que nunca deixaria que eu perdesse em nenhum momento da vida.

Aos amigos da família 12duoito, que me proporcionaram alegria nos raros momentos de descanso desta jornada.

Agradeço à Nara, ao Gordo, ao Arnaldo Franklin, ao Corey, a Moa, a Mavra, ao Ayko, à Bianca, ao Chedan e aos pequenos Logan e Kayla por me fazerem cada dia mais gostar de cães. Obrigado por serem fiéis amigos e não me deixarem desgostar do que faço.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

Deus abençoe a todos!

Aos animais deste experimento, que sentem a perda da liberdade, que doam suas vidas para salvar outras, que às vezes sentem dor e não compreendem que lambem a mão do algoz confundindo com a de um amigo, que não tem culpa de viverem na rua e mesmo assim, se ainda pudessem encontrar o ser humano que os abandonou, perdoariam.

“Apenas cansado, procurando uma maneira de se evoluir. Com quanta fé se move uma montanha? Um peso fardado, que carregado por um ombro vai além do fim. Será que frágeis frases trazem flores? Um dia alguém me disse assim: pare de sonhar! Mas foi por não parar de rir que decidi continuar...”

(banda 12duoito)

Colaboradores

Este trabalho contou com os seguintes colaboradores:

Prof. Hélio Chiarini Garcia Dep. de Morfologia/ICB/UFMG

Prof. Marilene S. M. Michalick Dep. de Parasitologia ICB/UFMG

Prof. Washington Luiz Tafuri Departamento de Anatomia Patológica Faculdade de Medicina/UFMG

Laboratórios Envolvidos no Projeto

Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL) do Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG;

Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do Departamento de Morfologia ICB/UFMG;

Laboratório de Protozoonoses do Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG.

Financiadores

Este trabalho foi parcialmente financiado por recursos do Projeto de Extensão do Departamento de Patologia Geral – Fundep (Fundação Desenvolvimento da Pesquisa).

Comitê de Ética em Pesquisa – UFMG

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal CETEA/UFMG – protocolo N°. 218/09.

Resumo

São poucas as descrições das alterações patológicas e parasitológicas relacionadas ao envolvimento do trato gastrointestinal (TGI) na leishmaniose visceral canina e, sobretudo considerando-se o TGI de forma sistemática. Assim, neste trabalho objetivou-se um estudo sistemático, clínico, anatomopatológico e parasitológico do TGI de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte, MG. Após confirmação sorológica (RIFI e ELISA) e parasitológica (esfregaço de medula óssea) para *L. chagasi*, os animais foram divididos clinicamente em três grupos: sintomáticos (n =6) quando a manifestação de pelo menos um sinal clínico sugestivo de leishmaniose visceral; assintomáticos (n=6) quando da ausência de sinais clínicos e o grupo controle não infectado (n=3). Os animais foram eutanasiados e amostras dos segmentos do TGI: esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto foram coletados e fixados em formalina 10%, e solução de Carnoy's sob refrigeração (4°C), posteriormente incluídos em parafina e em resina de glicol-metacrilato (GMA), respectivamente. As amostras do TGI foram avaliadas pelas técnicas de imuno-histoquímica e colorações de rotina (H&E, azul de toluidina, Dominici e PAS). Seborréia seca, e onicogribose foram alterações visualizadas em maior proporção. Na análise macroscópica do TGI, não foram observadas alterações anatomopatológicas marcantes nos animais incluídos no experimento. Os animais infectados, apresentaram um aumento das células inflamatória da lâmina própria e submucosa dos segmentos do TGI (com exceção do esôfago) em comparação com os animais controles. Um exsudato de células mononucleadas foi encontrado, com predominância de plasmócitos, macrófagos, e linfócitos sendo raramente encontradas células polimorfonucleares como neutrófilos e eosinófilos. Com grande facilidade podiam ser vistos macrófagos com morfologia peculiar, com visualização do parasito ou a presença de vacúolos em seu interior. A marcação imuno-histoquímica pela técnica da imunoperoxidase descrita por Tafuri e colaboradores (2004) mostrou resultados satisfatórios quando utilizada em todo o TGI. Durante a avaliação observou-se que as regiões de marcação positiva, apresentam formas amastigotas facilmente localizáveis nos segmentos de lâmina própria e submucosa do TGI. Das marcações de formas amastigotas 88,8% foram encontradas em maior proporção subjacentes a muscular da mucosa, na base da lâmina própria. Dos 6 animais onde as marcações positivas também foram localizadas nas porções anteriores do TGI (estômago, duodeno e íleo) 100% das formas amastigotas foram encontradas em maior proporção próximas ao lúmen intestinal, dentro das vilosidades logo abaixo do epitélio intestinal. De fato as regiões morfometricamente mais parasitadas foram à região de duodeno nos grupos assintomáticos seguida pelo ceco, do grupo sintomático. Regiões de cólon, reto, íleo e estômago também apresentaram marcações positivas. Não foram encontrados marcações de amastigotas do parasito em esôfago e jejuno dos cães infectados. A técnica de inclusão em GMA em tecido canino mostrou-se de grande importância para as avaliações do experimento, apresentando um melhor resultado para as avaliações quando utilizado técnicas rotineiras de histologia quando comparados com a inclusão em parafina. Observou-se diferença estatística na avaliação dos mastócitos em esôfago, jejuno, íleo, ceco e cólon. A utilização da inclusão de material biológico (TGI de cães) em resina plástica de metacrilato, mostrou resultados satisfatórios

para as colorações rotineiras de histologia, padronizadas de acordo com o nosso projeto. A LVC apresenta diversos sinais clínicos, sendo as alterações dermatológicas consideradas comuns na doença. Entretanto alterações clínicas no TGI não são facilmente encontradas apesar da presença do parasito no mesmo ser comumente encontrada.

Abstract

There are few descriptions of parasitological and pathological changes related to the involvement of the gastrointestinal tract (TGI) and canine visceral leishmaniasis (CVL), especially considering the TGI systematically. Thus, the aim of this work was investigated and correlated, physical clinical evaluation and TGI parasitological data of naturally infected dogs with *Leishmania (Leishmania) chagasi* from the metropolitan region of Belo Horizonte, MG. After serological (IFAT and ELISA) and parasitological (bone marrow smear) positive results for *L. chagasi*, the animals were clinically classified into two groups: symptomatic dogs (n = 6) when at least one clinical alteration suggestive of CVL had been observed, asymptomatic dogs (n = 6) when was not observed clinical alteration. Another group, formed by uninfected dogs was included as control group (n = 3). The animals were euthanized and the samples of TGI: esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon and rectum were collected and fixed in formalin 10%, then embedded in paraffin, and solution Carnoy's under refrigeration (4 ° C) embedded in glycol methacrylate resin (GMA). TGI samples were evaluated by immunohistochemistry assay and staining assy (H&E, Toluidine blue, PAS and Dominici). Dry seborrhea and onychogryphosis changes were seen in greater proportion. The infected animals showed an inflammatory cells increase in the TGI lamina propria and submucosa (except the esophagus) compared with control animals. Mononuclear cells were found, manly plasma cells, macrophages and lymphocytes. Macrophages could be seen with peculiar morphology, with parasite visualization of the or the presence of vacuoles inside the immunohistochemical staining technique described by Tafuri et al., 2004 immunoperoxidase showed satisfactory results when used throughout the GI tract. During the evaluation it was observed that the regions of positive marking, amastigotes have easily located in the segments of the lamina propria and submucosa of the GI tract. Markings of amastigotes were found in 88.8% higher proportion underlying muscularis mucosae at the base of the lamina propria. Of the six positive animals where the markings were also located in the anterior portions of the GI tract (stomach, duodenum and ileum) 100% of amastigotes were found in greater proportion close to the lumen, within the villi of the intestinal epithelium below. In fact, the most infested areas were morphometrically the region of the duodenum followed by the cecum groups asymptomatic, the symptomatic group. Regions of the colon, rectum, stomach and ileum also showed positive markings. There were no markings of amastigotes of the parasite in the esophagus and jejunum of infected dogs. The technique of embedding in GMA fabric dog proved to be of great importance for the evaluation of the experiment, with a best result for the evaluation techniques used when routine histology compared with paraffin wax.

There was statistical difference in the evaluation of mast cells in the esophagus, jejunum, ileum, cecum and colon. The use of the inclusion of biological material (TGI dog) in methacrylate plastic resin, showed satisfactory results for routine histology stains, standardized according to our project. The LVC has several clinical signs, the changes being considered common dermatological disease. However changes in clinical TGI are not easily found despite the presence of the parasite is commonly found in the same.

Lista de Ilustrações

GRÁFICO 1	Alterações clínicas observadas no grupo de cães sintomáticos naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> (n=6)	31
GRÁFICO 2	Avaliação das alterações histopatológicas nos cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> , sintomáticos (n=6) e assintomáticos (n=6)	36
GRÁFICO 3	Análise morfométrica da área de amastigotas imunomarcadas (μm^2) no trato gastrintestinal (TGI) de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> (n=12)	39
GRÁFICO 4	Análise morfométrica da área de amastigotas imunomarcadas (μm^2) no trato gastrintestinal (TGI) de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes ao grupo de cães sintomático (n=6)	40
GRÁFICO 5	Análise morfométrica da área de amastigotas imunomarcadas (μm^2), no trato gastrintestinal (TGI) de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes ao grupo assintomático (n=6)	40
GRÁFICO 6	Análise morfométrica de mastócitos em amostras de esôfago de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes ao grupo sintomático (n=6), assintomático (n=6) e não infectados - grupo controle (n=3)	46
GRÁFICO 7	Análise morfométrica de mastócitos em amostras de jejuno de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes aos grupos: sintomático (n=6) e assintomático (n=6) e não infectados - grupo controle (n=3)	47
GRÁFICO 8	Análise morfométrica de mastócitos em amostras de ceco de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes aos grupos: sintomático (n=6) e assintomático (n=6) e não infectados - grupo controle (n=3)	47
GRÁFICO 9	Análise morfométrica de mastócitos em amostras de cólon de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes aos grupos: sintomático (n=6) e assintomático (n=6) e não infectados - grupo controle (n=3)	47
GRÁFICO 10	Análise morfométrica de células inflamatórias em amostras de ceco de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes aos grupos: sintomático (n=6) e assintomático (n=6) e não infectados - grupo controle (n=3)	48
GRÁFICO 11	Análise morfométrica de epitélio intestinal em amostras de duodeno de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes aos grupos: sintomático (n=6) e assintomático (n=6) e não infectados - grupo controle (n=3)	48
GRÁFICO 12	Análise morfométrica dos componentes da matriz extracelular de amostras de esôfago de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes aos grupos: sintomático (n=6) e assintomático (n=6) e não infectados - grupo controle (n=3)	49

GRAFICO 13	Análise morfométrica dos componentes da matriz extracelular de amostras de jejuno de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes aos grupos: sintomático (n=6) e assintomático (n=6) e não infectados - grupo controle (n=3)	49
GRAFICO 14	Análise morfométrica dos componentes da matriz extracelular de amostras de cólon de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> pertencentes aos grupos: sintomático (n=6) e assintomático (n=6) e não infectados - grupo controle (n=3)	49
FIGURA 1	Ambiente de trabalho do programa KS400 que exibe algumas das janelas utilizadas para realizar a análise morfométrica dos mastócitos, células inflamatórias, epitélio intestinal e componentes da matriz extracelular	29
FIGURA 2 A-D	Corte histológico de fragmentos de intestino grosso (cólon) incluídos em parafina de cães controle e naturalmente infectados .	32
FIGURA 3 A-D	Corte histológico de fragmentos de intestino grosso (cólon) incluídos em parafina de cão assintomático e naturalmente infectado com <i>Leishmania (L.) chagasi</i> :	34
FIGURA 4 A-D	Corte histológico de fragmentos de intestino grosso (colon) incluídos em parafina de cão assintomático naturalmente infectado com <i>Leishmania (L.) chagasi</i> :	35
FIGURA 5 A-C	corte histológico de fragmentos de intestino grosso (colon) incluídos em parafina de cão sintomático naturalmente infectado com <i>Leishmania (L.) chagasi</i> :	37
FIGURA 6 A-C	corte histológico de fragmentos de intestino delgado (duodeno) incluídos em parafina de cão assintomático naturalmente infectado com <i>Leishmania (L.) chagasi</i> :	38
FIGURA 7 A-D	corte histológico de fragmentos de intestino grosso (colon) incluídos em glicol metacrilato (gma) de cão sintomático naturalmente infectado com <i>Leishmania (L.) chagasi</i> :	42
FIGURA 8 A-D	corte histológico de fragmentos de intestino delgado (duodeno) incluídos em glicol metacrilato (GMA) de cão sintomático naturalmente infectado com <i>Leishmania (L.) chagasi</i> :	43
FIGURA 9 A-C	corte histológico de fragmentos de reto incluídos em glicol metacrilato (GMA) de cão sintomático naturalmente infectado com <i>Leishmania (L.) chagasi</i> :	43
FIGURA 10A-D	corte histológico de fragmentos do estomago (A,B) e cólon (C,D) incluídos em glicol metacrilato de cão sintomático naturalmente infectado com <i>Leishmania (L.) chagasi</i> :	44

Lista de Tabelas

TABELA 1	Regiões de maior proporção de marcações positivas de amastigotas de <i>Leishmania (L.) chagasi</i> pela técnica de imunohistoquímica nos cães infectados(n=12):	38
-----------------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

OMS - Organização Mundial de Saude

LV – leishmaniose visceral

Lu. – *Lutzomya*

SFM – sistema fagocítico mononuclear

TGI – trato gastrintestinal

LVC – leishmaniose visceral canina

OPG – ovos por Grama de fezes

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GMA – glicol-metacrilato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1 Leishmanioses.....	18
1.2 Leishmaniose Visceral	18
1.3 Leishmaniose Visceral canina	20
1.3.1 Alterações clínicas.....	21
1.4 Comprometimento do trato gastrointestinal na LV	21
1.4.1 Comprometimento na LV	21
1.4.2 Comprometimento na LVC	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Manuseio dos animais.....	25
3.3 Grupos experimentais	26
3.4 Protocolos anestésicos para biópsias de pele e eutanásia.....	26
3.5 Eutanásia e necropsia	27
3.6 Padronização da técnica de inclusão em glicolmetacrilato e de colorações histoquímicas no TGI canino	27
3.7 Reação imuno-histoquímica para identificação de formas amastigotas de Leishmania	27
3.8 Análise morfométrica	28
3.8.1 Análise morfométrica do parasitismo tecidual.....	28
3.8.2 Análise morfométrica dos mastócitos, células inflamatórias, epitélio intestinal e componentes da matriz extra celular no TGI de tecidos incluídos em GMA	28
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 CETEA	30
6 RESULTADOS	30
6.1 Avaliação clínica	30
6.2 Avaliação macroscópica	31
6.3 Avaliação Histopatológica.....	31
6.4 Avaliação qualitativa pela imuno-histoquímica.....	36
6.5 Avaliação quantitativa pela imuno-histoquímica	39
6.6 Análise morfométrica dos mastócitos, células inflamatórias, epitélio intestinal e componentes da matriz extracelular no TGI de tecidos incluídos em GMA	41
6.7 Avaliação dos mastócitos	46
6.8 Avaliação das células inflamatórias	47
6.9 Avaliação do epitélio	48
6.10 Avaliação dos componentes da matriz extracelular.....	48
7 DISCUSSÃO	50
8 CONCLUSÕES	60
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
Anexo 1.....	71
Anexo 2.....	72
Anexo 3.....	76
Anexo 4.....	79
Anexo 5.....	80
Anexo 6.....	80

1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas um conjunto de síndromes de grande complexidade a qual acometem seres humanos e animais. Constitui uma das seis mais importantes doenças infecciosas mundiais, sendo que algumas apresentam importante caráter zoonótico (Denves, 2008). É causada por protozoários digenéticos, do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastidae (Ross, 1906), apresentando várias formas morfológicas distintas. Agrupam-se no gênero cerca de 30 espécies, sendo aceito que, aproximadamente 21 tenham capacidade de produzir alterações patológicas na espécie humana (Herwaldt, 1999; Ashford, 2000). Cita-se que Escomuel (1911), Lindenberg (1909), Splendore (1912) e Vianna (1911) descreveram os primeiros casos e características da doença e do parasito (Veronesi & Focaccia, 1996). As lesões recebiam nomes das regiões onde elas ocorriam como, ferida de Balkh (norte do Afeganistão), botão de Aleppo (na Síria), botão de Bagdá (Iraque), e botão do oriente, no primeiro século d.C., na Ásia Central. Na América ficou conhecida em cerâmicas peruanas e equatorianas dos anos de 400 a 900 d.C. com a documentação das faces humanas com mutilações do nariz e dos lábios. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1990 a prevalência era de 12 milhões de casos humanos, em todo o mundo, com uma incidência anual de 500 mil, sendo que 90% desses ocorreram em países como Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão.

O espectro clínico das leishmanioses manifesta-se sob quatro formas: cutânea (LC), muco-cutânea (MC), cutâneo-disseminada (LCD) e visceral (LV) (Grimaldi & Tesh, 1993). A LV constitui a forma mais grave, sistêmica, sendo fatal quando não tratada (WHO, 2006). Segundo Nieto et al. (1999), cerca de um terço da população mundial reside em áreas endêmicas da doença.

1.2 A Leishmaniose Visceral

A *Leishmania (Leishmania) donovani* é o agente etiológico da LV na China, Paquistão, China oriental, Nepal, Sudão, Bangladesh e Quênia; a *Leishmania infantum* nos países da Bacia do Mediterrâneo e a *Leishmania chagasi* nos países

do Novo Mundo (Guerin et al., 2002). De acordo com estudos moleculares essas duas últimas são consideradas co-específicas (Maurício, et al., 1999).

A LV é uma antropozoonose na Índia, Nepal, Paquistão, China e Bangladesh, ao passo que, apresenta um caráter de zoonose em países da Bacia do Mediterrâneo e América do Sul.

No Brasil, a transmissão é feita pela picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae da espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*. A *Leishmania infantum* também é transmitida pelo *Lu. cruzi* no Brasil (Dos Santos et al., 2003) e *Lu. evansi* na Colômbia e Venezuela (Bejarano et al., 2001; Feliciangeli et al., 1999).

Canídeos (cães, raposas e chacais), marsupiais (como o gambá) e alguns roedores podem ser considerados reservatórios da doença em regiões endêmica (Cardoso & Cabral, 1998).

A transmissão ao homem ocorre durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos. A infecção inicia-se quando o inseto-vetor regurgita formas promastigotas do parasito em seu estágio infectante metacíclico, nas chamadas “piscinas de sangue” na derme dos hospedeiros vertebrados. Após a inoculação, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos da pele, onde sofrem transformação para formas aflageladas e ovóides conhecidas como amastigotas, que se multiplicam dentro dos endossomos das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) por divisão binária até ocuparem todo o citoplasma dessa célula, podendo até mesmo deslocar o núcleo da mesma lateralmente para dar espaço ao vacúolo formado pelas amastigotas (Russell, 1989). O abarrotamento desta célula, repleta de amastigotas, leva a lise da membrana celular liberando novas amastigotas para infectar novas células. Em novo repasto sanguíneo, as fêmeas ingerem as formas amastigotas do parasito existentes no citoplasma do SFM presentes na derme do hospedeiro infectado e componente do repasto sanguíneo. No intestino médio do flebótomo, as formas amastigotas sofrem várias transformações, migram para as porções anteriores do tubo digestório, onde sofrem modificação para sua forma promastigota metacíclica infectante (Chang, 1979; Lima, 2007).

Ainda não se sabe exatamente o porquê da maioria dos países da América Latina, não possuírem um controle eficaz da doença (Werneck et al. 2002; Bern et al. 2008; Zerpa et al., 2003). Dados epidemiológicos no Brasil apontam para um total

de 50.060 casos clínicos de LV entre 1990 e 2006 perfazendo 90% do total de casos de LV nas Américas (sem levar em consideração os casos de subnotificação). Um fato que corrobora esses dados consiste na crescente urbanização e expansão para regiões ao sul do país, uma vez que inicialmente a doença atingia somente as regiões rurais do Nordeste (1980) e hoje grandes centros urbanos da região Sudeste, já são consideradas áreas endêmicas (Romero, 2010) .

Resultados recentes mostram que no estado de Minas Gerais em uma década o número de casos de LV cresceu 278%, saindo dos 200 casos humanos registrados em 2001 e passando para 556, em 2010. Antes, a enfermidade atingia 46 municípios e em 2010 chegou a 200 municípios. Os óbitos mais do que dobraram, passando de 25 casos para 57 casos, um crescimento de 128%. No ano de 2011, dados captados até julho, já são 134 casos só em Minas Gerais de pessoas infectadas (Secretaria do Estado de Saúde, 2011).

1.3 A Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose visceral canina (LVC) tem grande importância epidemiológica, devido à alta prevalência e ao intenso parasitismo cutâneo dos cães, que favorece a infecção do vetor e a transmissão ao homem. O desenvolvimento e progressão da doença nos cães são altamente variáveis. Alguns cães desenvolvem a infecção sintomática, muitas vezes fatal, enquanto outros permanecem assintomáticos, ou desenvolvem um ou poucos sinais clínicos. Anormalidades dermatológicas nos cães sintomáticos são bastante comuns e variáveis quanto à caracterização e extensão; hiperqueratose, descamações, despigmentações e ulcerações principalmente nas extremidades dos membros e no focinho são facilmente encontradas.

As lesões encontradas na LVC, com exceção das alterações cutâneas são similares às descritas na doença humana (Keenan et al., 1984b). As lesões histológicas são principalmente associadas à hipertrofia e hiperplasia do infiltrado linfoplasma-histiocitário. As alterações histopatológicas mais frequentes são observadas em baço, fígado, medula óssea, linfonodos, rins, pulmões e tegumento (Genaro, 1993; Tafuri, 1995).

1.3.1 – Alterações Clínicas:

As lesões de pele mais comumente encontradas são dermatites e alopecias. Neto (2010) observou em seu grupo experimental infectado a presença de alopecia e onicogribose em 70% dos casos, semelhante ao percentual que Toplu e Aydogan (2011) observaram em seu experimento (68,1% dos casos). Já Lima (2007) observou ulcerações de pele somente em 29,6% dos animais do seu experimento sendo a onicogribose, uma lesão encontrada em 59,3% dos casos. As alterações oculares mais comumente encontradas são as blefarites, uveítes, conjuntivites, ceratoconjuntivite seca e alopecia periocular. A conjuntiva é a estrutura ocular mais acometida pela doença (Slappendel, 1988; Fulgêncio et al., 2007).

As alterações bioquímicas comumente encontradas são anemia normocítica normocrômica, leucopenia, trombocitopenia, aumento das proteínas séricas totais com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia diminuição da relação albumina/globulina (Reis et al., 2006; Cardoso et al., 1998; Reis et al., 2006; Abreu et al., 2011).

Toplu e Aydogan (2011) descreveram alguns achados clinico-patológicos considerados incomuns como uma ulceração extensa e profunda no lábio inferior esquerdo de um animal, hemorragia em vesícula urinária e intestino delgado. Sendo que, análise microscópica pela imunohistoquímica, os autores encontraram amastigotas na língua e nos intestinos.

1.4 - Comprometimento do Trato Gastrointestinal na LV:

1.4.1 – Comprometimento na LV:

O envolvimento do TGI no homem (Rosenthal et al., 1988; Laguna et al., 1994a; Laguna et al., 1994b; Villanueva et al., 1994; Alonso et al., 1997; Hamour et al., 1998) já foi descrito. Muigai e colaboradores em 1980, em um estudo da função do intestino delgado em pacientes humanos com LV notaram uma redução da absorção de vitamina A e açúcar d-xilose. Na microscopia observaram presença do parasitismo na mucosa jejunal e infiltrado moderado de células inflamatórias compostos por linfócitos, plasmócitos, e macrófagos. Em 1995, Freitas et al., verificaram em crianças, portadoras de LV, o comprometimento da mucosa intestinal além de evidenciarem a presença de amastigotas de *Leishmania*. Esses autores ainda observaram que existe uma correlação entre o parasitismo e as alterações

patológicas, ou seja, quanto menor o grau de parasitas menor a intensidade das alterações patológicas (Silva, 2001).

Estudos envolvendo pacientes com LV e portadores do vírus HIV, revelaram o surgimento de formas atípicas da doença como em casos de leishmaniose esofágica (Villanueva et al., 1994), distúrbios intestinais (Laguna et al., 1997, Alonso et al., 1997; Hamour et al., 1998) e diarreias crônicas (Roig et al., 1993). Araújo (2010) também descreveu a doença em paciente após transplante de fígado. Observou-se no exame de colonoscopia a presença de hiperemia e mucosa colônica friável, além de diarreia crônica sanguinolenta por um período aproximado de três meses sem histórico de febre.

1.4.2 - Comprometimento na LVC:

Anderson e colaboradores em 1980 relataram a presença de macrófagos parasitados por amastigotas de *Leishmania* na lâmina própria e submucosa de estômago, duodeno, jejuno, íleo, cólon de um cão com LV. Posteriormente, Keenan et al., (1984b) também observaram alterações do TGI de cães experimentalmente infectados com *L. chagasi* e *L. donovani*. Em 1990, González e colaboradores relataram a ocorrência de um quadro de colite ulcerativa em cães experimentalmente infectados com *L. infantum*, caracterizado histologicamente pela presença de amastigotas na mucosa e submucosa do cólon, associados à reação inflamatória difusa constituída de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Ferrer et al., descreveram em 1991 quadros de diarreia crônica como primeira manifestação clínica apresentada pelos animais. Histologicamente os animais apresentaram quadros de colite com infiltração intensa de células inflamatórias, principalmente na mucosa, muscular da mucosa e submucosa do cólon. Os autores observaram ainda que células inflamatórias eram em sua maioria macrófagos, parasitados por amastigotas de *Leishmania*, plasmócitos, linfócitos e alguns neutrófilos.

Hervás e colaboradores em 1996 relataram o comprometimento do TGI em um chacal (*Canis aureus*) com LV. Nesse animal foi observada hemorragia gástrica associada à presença de macrófagos parasitados com *Leishmania* na lâmina própria do estômago. Os autores também observaram infiltração inflamatória difusa na mucosa e submucosa do intestino delgado e grosso composta predominantemente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos parasitados.

De acordo com resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa tanto em dissertação de mestrado (Silva, 2001) quanto em artigo científico (Silva et al. 2002), formas amastigotas de *Leishmania* são facilmente observadas ao longo de todas as porções do TGI (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon). De fato, Silva et al. (2002), independentemente das diferentes formas clínicas dos animais, descreveu a presença das amastigotas no interior de macrófagos de todas as camadas histológicas desses segmentos, a saber: mucosa (lâmina própria), submucosa, muscular da mucosa e camada muscular. Todavia, apesar do parasitismo intenso em todos os segmentos do TGI, não foi encontrado lesões acentuadas associadas. A arquitetura do intestino, bem como a celularidade da lâmina própria não se alteram mesmo em presença de grande número de parasitas. Adicionalmente, Silva (2001) relatou diferenças estatísticas no parasitismo nas porções finais do TGI (ceco e cólon) que são mais intensos nesta região intestinal em comparação com as demais. A partir das revisões percebe-se uma grande variância nos achados clínicos associados com os achados anatomopatológicos, sendo os achados de cada trabalho importantes, porém pouco abrangentes na avaliação sistemática de todo o sistema gastrointestinal. Assim, objetivamos dar continuidade a essa linha de pesquisa envolvendo o TGI na LVC, aprofundando nossos conhecimentos a respeito da morfologia, das alterações patológicas, do parasitismo bem como das suas associações ao quadro clínico geral e digestivo dos animais, avaliando o microambiente intestinal, mais precisamente a mucosa de todo o TGI. Ao que sabemos um estudo sistemático avaliando o perfil inflamatório e suas características correlacionadas com o status clínico do animal naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) chagasi* e a carga parasitária encontrada em todo o segmento não foram realizados. Assim, esse projeto teve como objetivo principal ampliar nossa linha de pesquisa em um estudo abrangente, qualitativo e quantitativo, dos aspectos clínicos, parasitológicos e anátomo-patológicos, com ênfase na caracterização do perfil celular presente na mucosa de todo o TGI, de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Correlacionar os aspectos clínicos aos achados anatomopatológicos e parasitológicos do trato gastrintestinal de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Seleção de animais naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* mediante testes sorológicos e parasitológicos em sequência à classificação clínica dos mesmos em assintomáticos e sintomáticos;
2. Padronização da técnica de inclusão em glicolmetacrilato e de colorações histoquímicas do trato gastrintestinal canino;
3. Análise histopatológica do trato gastrintestinal de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*;
4. Análise imuno-histoquímica qualitativa e quantitativa do parasitismo tecidual do trato gastrintestinal de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*;
5. Análise morfométrica dos mastócitos, células inflamatórias, epitélio intestinal e componentes da matriz extracelular do trato gastrintestinal, em tecidos incluídos em glicolmetacrilato;

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Os cães utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de Ribeirão das Neves, Minas Gerais. Como medida de vigilância sanitária, essa prefeitura após o levantamento sorológico realiza a captura e eutanásia dos animais soropositivos.

Doze cães, sem raça e idade definidas, com exames sorológicos, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) positivos e três cães com sorologia negativa para *Leishmania* foram obtidos do CCZ. Após avaliação clínica criteriosa, e o exame de pesquisa direta de formas amastigotas de parasitos em material obtido de biópsias de medula óssea costal (esfregaços por aposição corados Giemsa) e exame positivo para imunohistoquímica pela técnica estreptoavidina peroxidase Tafuri et al., (2004) em biópsias de pele, os cães foram classificados em assintomáticos, quando nenhum sinal clínico sugestivo da infecção foi observado. Os cães classificados como sintomáticos, quando pelo menos um sinal sugestivo da doença foi evidenciado, como anemia clínica, lesões de pele (alopecia, seborreia, ulcerações, onicogribose), linfadenopatia e *score* corporal reduzido.

3.2. Manuseio dos animais

Os animais naturalmente infectados passaram por um período de “quarentena”, sendo que os animais receberam três doses de vacina déctupla Vanguard[®] em um intervalo de 21 dias e uma dose de vacina antirrábica Defensor[®] (Pfizer[®], Brasil), bem como medicação anti-helmíntica oral de amplo espectro com pamoato de pirantel (144mg), praziquantel (50mg) e febantel (660mg) para cada dez quilos de peso (Helfine cães[®], Agener União, Brasil) repetidas a cada 15 dias até o período da necropsia. Foram empregados produtos tópicos de efeito ectoparasiticida prolongado (Top Line[®], Merial Saúde Animal) e repelentes contra flebotomíneos (Scalibor[®], Intervet, Holanda).

Os cães foram mantidos no canil do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde receberam água e alimentação industrializada *ad libitum*. Foram distribuídos em baias coletivas e, com o objetivo de se obter grupos experimentais mais homogêneos foram estratificados de acordo com o sexo e porte seguindo os padrões de distribuição por grupos (sintomático, assintomático e controle). Estas baias são teladas e ventiladas, respeitando a lotação de cinco animais/baia. Estas foram diariamente higienizadas com hipoclorito de sódio a 1% e borrifadas com piretróides. Estes animais ficaram no canil por um período relativamente curto de tempo (menos de dois meses aproximadamente) sendo que obrigatoriamente todos os procedimentos pertinentes ao estudo foram

conduzidos nas dependências do canil. Uma avaliação clínica foi realizada durante o período que os animais estiverem no canil e outra realizada antes da necropsia.

3.3. Grupos experimentais

Os 15 cães obtidos foram assim distribuídos:

Grupo I – Animais naturalmente infectados - Sintomáticos: seis cães adultos, sem raça e idade definidas, que apresentam de forma evidente sinais clássicos da LVC;

Grupo II – Animais naturalmente infectados - Assintomáticos: seis cães adultos, sem raça e idade definidas, aparentemente saudáveis sem sinais clínicos típicos de LVC;

Grupo III – Controle: três cães, provenientes de área endêmica (Ribeirão das Neves, MG) mantidos no canil do ICB, com sorologia e parasitologia negativa para *Leishmania (Leishmania) chagasi* foram usados como controle para os grupos I e II.

Todos os animais que apresentaram durante a seleção e concepção dos grupos alterações vitais, tais como: desidratação acentuada, caquexia grave, estado de debilidade física, bem como distúrbios do TGI como vômitos, diarreias que durante a avaliação sugeriram infecção por outras doenças, não foram incluídos nos grupos.

3.4. Protocolo anestésico para biópsias de pele e eutanásia

Todos os animais foram anestesiados com associação de 1,0mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (2%) (Anesedan[®], Vetbrands, Brasil) e 10mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (10%) (Ketamina Agener[®], Agener União, Brasil) por via intramuscular. Dez minutos após a indução anestésica foi administrado Diazepam 0,5mg/Kg por via endovenosa.

3.5. Eutanásia e necropsia

A eutanásia dos animais cumpriu a Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os Procedimentos e Métodos de Eutanásia em Animais e dá outras providências. Desta forma, após o protocolo anestésico descrito anteriormente seguiu-se a utilização do fenobarbitúrico Tiopental (Tiopenthax,) sódico 2,5% (1mL/kg) por via endovenosa até a obtenção do plano anestésico profundo e posteriormente foi administrado, por via endovenosa lenta, o curarizante T-61[®] (0,3mL/Kg) até obtenção de parada cardiorrespiratória, relaxamento dos esfíncteres, ausência de pulso e miose (Lima et al., 2007). Foi realizada necropsia completa de todos os cães, entretanto, para o presente estudo somente serão mencionados os achados referentes às amostras obtidas dos segmentos do TGI: esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto. Desta forma, o TGI foi analisado macroscopicamente levando-se em consideração critérios como presença de lesões, aspecto e consistência. As amostras, supracitadas, foram imediatamente fixadas por duas soluções; formalina tamponada a 10% (pH 7,2) por período máximo de 48 horas, solução Carnoy's (álcool PA, clorofórmio PA, ácido acético PA 6:3:1) à 4°C por período máximo de 3 horas.

3.6. Padronização da técnica de inclusão em glicolmetacrilato (GMA) e de colorações histoquímicas no TGI canino

Os tecidos incluídos em glicolmetacrilato (GMA) foram utilizados para a avaliação anatomopatológica. Após a fixação os tecidos foram incluídos de acordo com a técnica adaptada da apostila de inclusão em resina plástica (Anexo A), e corados pelas técnicas de histologia como hematoxilina & esoina (H&E), azul de toluidina, Dominici, ácido periódico-schiff (PAS), todos descritos de acordo com a apostila de inclusão e resina plástica descrita por Chiarini-Garcia (1996) com modificações (Anexo B).

3.7. Reação imuno-histoquímica para identificação de formas amastigotas de *Leishmania*

Os tecidos fixados em formalina 10% foram processados em histotécnico automático para desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo três fragmentos do mesmo segmento dos órgãos foram cortados em micrótomo na espessura de 5µm e montados em lâminas previamente desengorduradas com álcool-éter e banhadas em solução gelatinosa de fixação. A marcação de formas amastigotas de *Leishmania* foi realizada pela técnica da imuno-histoquímica (TAFURI et al., 2004), Anexo C. Todos os cortes foram examinados para a identificação das formas amastigotas e sua descrição topográfica.

3.8. Análise morfométrica

3.8.1. Análise morfométrica do parasitismo tecidual

Cortes histológicos em parafina do esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto, submetidos à reação imuno-histoquímica para identificação de formas amastigotas de *Leishmania*, foram avaliados através da objetiva de 40X no microscópio BX 40 (Olympus, Pensilvânia, EUA) para a digitalização de 25 imagens aleatórias da mucosa e de cada órgão, excetuando no esôfago onde foi feita análise da submucosa, através da microcâmera QColor 3 (Olympus). Utilizando uma sequência de algoritmos do programa KS400 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), a área total de marcação imuno-histoquímica (µm²) de cada imagem foi calculada através da seleção dos pixels com tons de marrom e subsequente criação de uma imagem binária (Lima et al., 2007). A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por Caliari (1997).

3.8.2. Análise morfométrica dos mastócitos, células inflamatórias, epitélio intestinal e componentes da matriz extracelular no TGI de tecidos incluídos em GMA

Cortes histológicos em GMA do esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto foram avaliados através da objetiva de 20X do microscópio BX40 (Olympus), para a digitalização de 10 imagens aleatórias da mucosa de cada órgão, excetuando no esôfago onde foi feita análise da submucosa, através da microcâmera QColor 3 (Olympus). Através do mesmo programa de morfometria, foi

construída em cada imagem, uma grade virtual de 100 pontos de interseção para o cálculo estimado do percentual dos seguintes componentes: mastócitos, células inflamatórias, epitélio intestinal e componentes da matriz extracelular como ilustrado na figura 1. Foi considerada como sendo a região “componentes da matriz extracelular”, qualquer componente do tecido conjuntivo presente na lâmina própria, excetuando epitélio, mastócitos e células inflamatórias (Modificado de Pinho et al., 2009).

Fig.1: Análise morfométrica no programa KS400

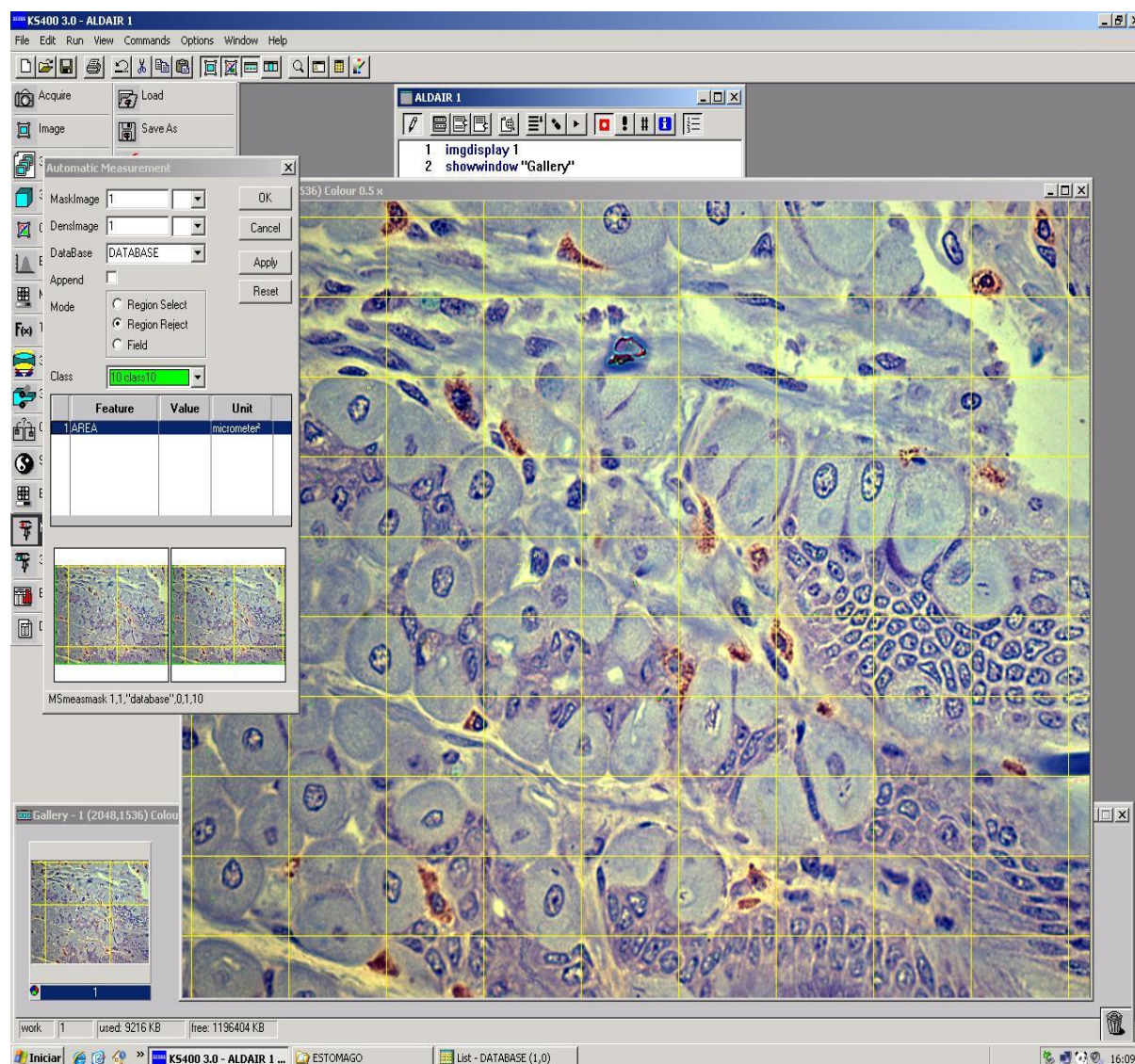


Fig.1: Ambiente de trabalho do programa KS400 que exibe algumas das janelas utilizadas para realizar a análise morfométrica dos mastócitos, células inflamatórias, epitélio intestinal e componentes da matriz extracelular.

4. Análise estatística

De acordo com a natureza dos dados, a comparação dos três grupos foi realizada através dos testes de comparações múltiplas ANOVA, Diferença Mínima Significativa (DMS) para análise entre os diferentes grupos, e o teste Tukey para analisar a diferença entre os seguimentos intestinais dentro do mesmo grupo. As análises foram realizadas por meio dos programas estatísticos computacionais Prism[®] 4,0, GraphPad InStat[®] e Minitab[®] 1.4, adotando um nível de significância de 95%.

5. CETEA

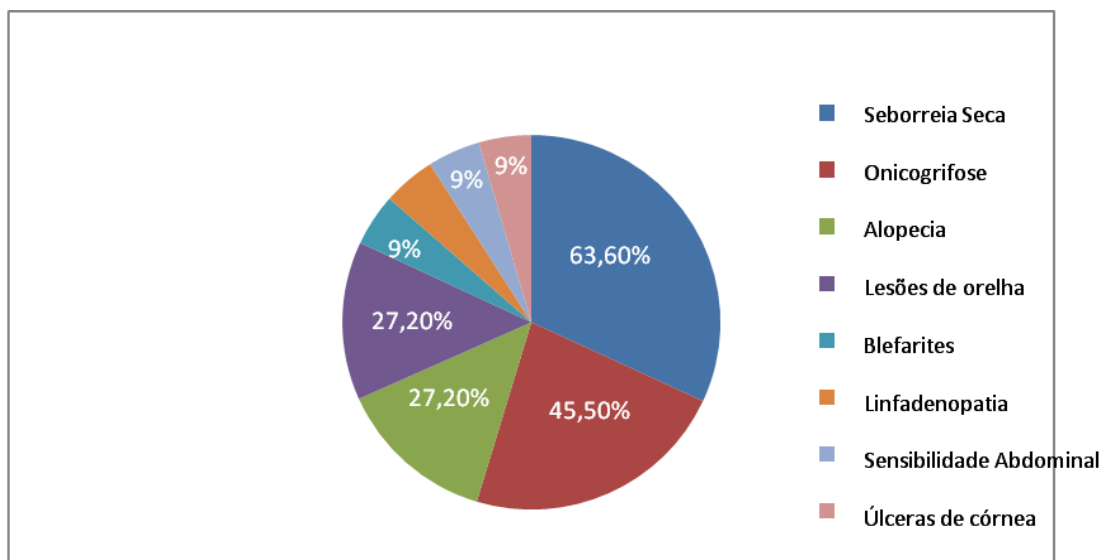
Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal CETEA/UFMG – protocolo N^o. 218/09 (Anexo D).

6. Resultados:

6.1. Avaliação Clínica:

Os principais achados clínicos foram lesões na pele, linfadenopatia e onicogribose. Seborréia seca, e onicogribose foram alterações visualizadas em maior proporção. A alopecia foi encontrada principalmente na face, órbita ocular, espelho nasal e extremidades dos membros. Como não foi mensurado o parâmetro de peso vivo dos animais, não se pode afirmar que os mesmos apresentaram perda de peso, porém a diminuição do escore corporal foi nitidamente encontrada. Dos animais infectados, 9% tiveram sensibilidade à palpação abdominal (variando de moderado a intenso grau). Ulcerações, descamações e alopecia da pele de pina de orelha foram visualizados em 27,2% dos casos, como mostra o gráfico 1:

Gráfico 1: alterações clínicas observada nos grupos infectados sintomáticos (n=6):



6.2. Avaliação Macroscópica

Na análise macroscópica do TGI, de um modo geral, não foram observadas alterações anatomopatológicas marcantes nos animais incluídos no experimento. Cerca de 33,3% (cinco cães; três sintomáticos e dois assintomáticos) apresentaram, mesmo com a vermifugação, presença de helmintos nas porções do intestino delgado e grosso.

Em um dos casos, o animal veio a óbito no período de quarentena, durante a necropsia observou uma herniação diafragmática, com rompimento da membrana diafragmática e extravasamento dos órgãos abdominais para a caixa torácica. Este animal apresentou congestão hepática e pulmonar, espessamento de alças intestinais com áreas de estrangulamento e foi excluído do experimento.

6.3. Avaliação Histopatológica:

Os animais infectados, de um modo geral, apresentaram um aumento das células inflamatória da lâmina própria e submucosa dos segmentos do TGI (com exceção do esôfago) em comparação com os animais controles. Um exsudato de células mononucleadas foi encontrado, com predominância de plasmócitos, macrófagos, e linfócitos sendo raramente encontradas células polimorfonucleares como neutrófilos e eosinófilos. Com grande facilidade podiam ser vistos macrófagos com morfologia peculiar, com núcleos grandes com cromatina frouxa e com visualização do parasita ou a presença de vacúolos em seu interior (Figura 2).

Figura 2

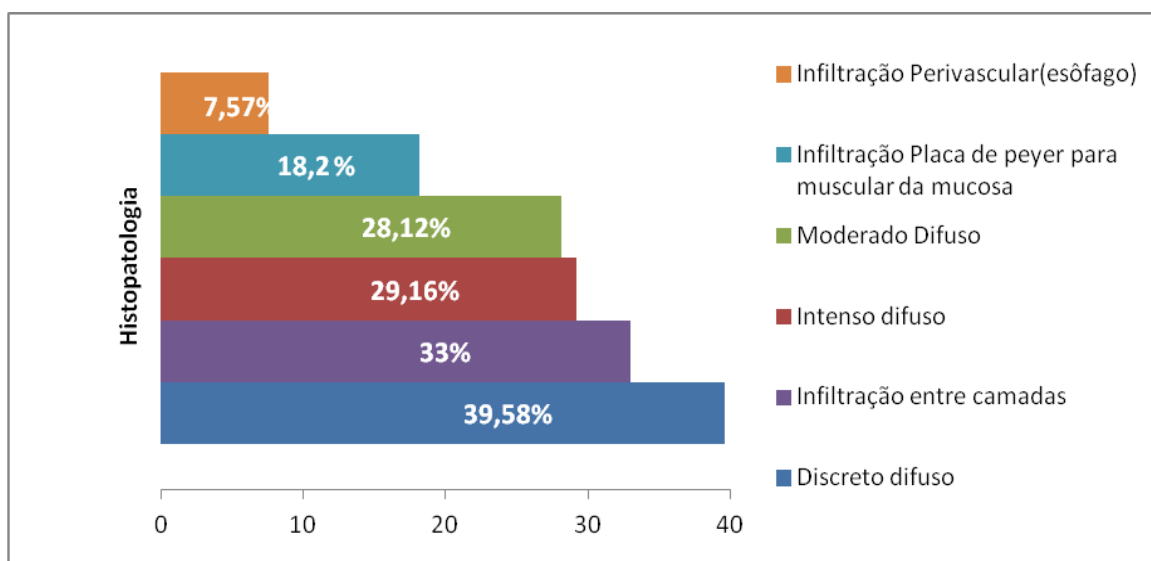
Foi possível observar também, a presença de células epitelióides e/ou gigantes normalmente associadas com infiltrado mononuclear e uma discreta atrofia epitelial em alguns animais. A análise microscópica pode revelar a presença de parasitismo, sem surgimento de grandes lesões como erosões ou úlceras na mucosa intestinal. De fato, os grupos dos animais naturalmente infectados mostraram a presença formas amastigotas de *Leishmania*, particularmente dentro de macrófagos na lamina própria dos segmentos estudados independente da forma clínica que estes animais apresentavam e sem causar danos marcantes ao tecido (Figura 3).

O somatório dos segmentos do TGI dos animais naturalmente infectados somam 96 segmentos, os quais foram avaliados qualitativamente. Dessas análises qualitativas, 39,58% (38/96 segmentos do TGI) apresentaram um aumento discreto difuso da celularidade nos segmentos histológicos, sendo que não foram observados focos inflamatórios ou aumento da celularidade discreta focal nos animais dos grupos do experimento. Em três casos (7,57%) destes que apresentaram aumento discreto e difuso da celularidade foram observados um infiltrado perivascular discreto sendo encontrado somente nos segmentos de esôfago dos animais avaliados. 28,12% (27/96) apresentaram um aumento de celularidade moderado e difuso por toda a lâmina própria. Animais que apresentaram um aumento moderado focal da celularidade somam 3,12% (3/96). Animais que apresentaram um aumento intenso difuso da celularidade somam 29,16% (28/96). Dos animais do experimento 33,3% apresentaram infiltração celular entre camadas histológicas, e destes 70% foram infiltrações celulares dos folículos linfóides (placas de Peyer visualizadas em 25% dos segmentos) extravasando pela muscular da mucosa e atingindo a lâmina própria como mostra a figura 4 e o Gráfico 2.

Figura 3

Figura 4

Gráfico 2 : Avaliação qualitativa das alterações histopatológicas no cães infectados com *Leishmania (L.) chagasi* sintomáticos (n=6) e assintomático (n=6) .



6.4. Avaliação qualitativa pela imuno-histoquímica

A marcação imuno-histoquímica pela técnica da imunoperoxidase descrita por Tafuri et al., (2004) mostrou resultados satisfatórios quando utilizada em todo o TGI. Durante a avaliação observou-se que as regiões de marcação positiva, apresentam formas amastigotas facilmente localizáveis nos segmentos de lâmina própria e submucosa do TGI. Na avaliação qualitativa dos grupos infectados, 10 animais (83,33%) apresentaram cargas parasitárias elevadas de fácil visualização pela marcação imuno-histoquímica sendo que em 9 animais foram encontrados em maior proporção marcações no intestino grosso (cinco região de ceco, cinco região e cólon e três região do reto) e são as regiões que mais normalmente se mais encontram macrófagos parasitados. Em 6 animais também foram encontradas marcações evidentes em intestino delgado (quatro região duodeno, três região de íleo) e um animal marcações evidentes encontrada no estômago. Destes 9 casos encontrados no intestino grosso, 8 deles (88,8%) as marcações de formas amastigotas foram encontradas em maior proporção subjacentes a muscular da mucosa, na base da lâmina própria (figura 5). Dos 6 animais onde as marcações positivas também foram localizadas nas porções anteriores do TGI (estômago, duodeno e íleo) 100% (6/6) das formas amastigotas foram encontradas em maior proporção próximas ao lúmen intestinal, dentro das vilosidades logo abaixo do epitélio intestinal como descrito no Tabela 1 e ilustrado na figura 6:

Figura 5 e

Figura 6

Tabela 1. Regiões de maior proporção de marcações positivas de amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* pela técnica de imunohistoquímica nos cães infectados(n=12):

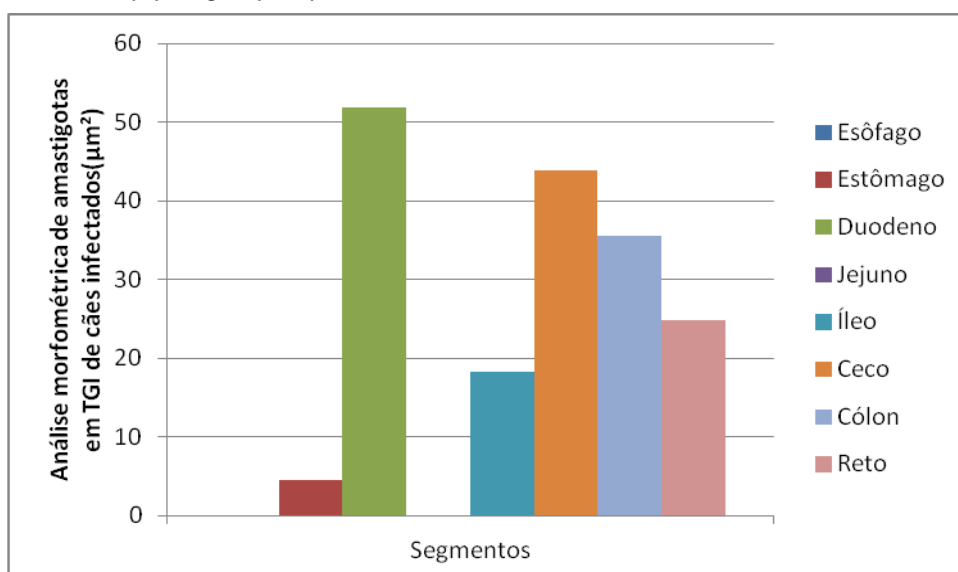
Região de maior marcações de amastigotas	Intestino Delgado				Intestino Grosso		
	Estômago	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Cólon	Reto
Amastigotas próximas ao lúmen intestinal	+	+++	S	++	S	S	+
Amastigotas próximas a muscular da mucosa	S	S	S	S	+++	+++	++

Legenda: S ausência de parasitismo
 + pouco parasitismo
 ++ moderado parasitismo
 +++ intenso parasitismo

6.5. Avaliação quantitativa pela imuno-histoquímica

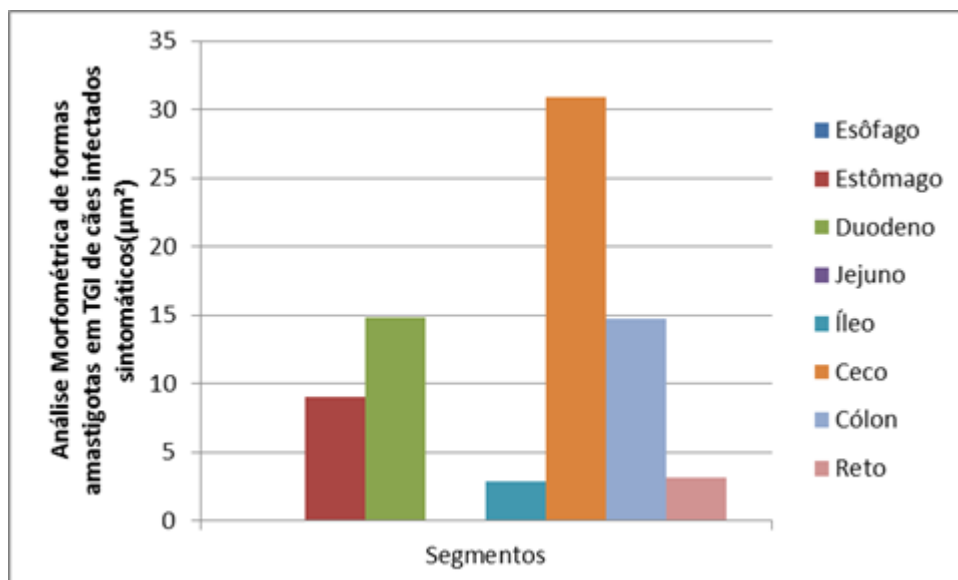
De fato as regiões morfometricamente mais parasitadas foram à região de duodeno nos grupos assintomáticos seguida pelo ceco, do grupo sintomático. Regiões de cólon, reto, íleo e estômago também apresentaram marcações positivas (Gráfico 3). Não foram encontrados marcações de amastigotas do parasito em esôfago e jejuno dos cães infectados:

Gráfico 3 : Análise morfométrica da área de amastigotas imunomarcadas (μm^2) no TGI de cães infectados por *Leishmania (L.) chagasi* (n=12):



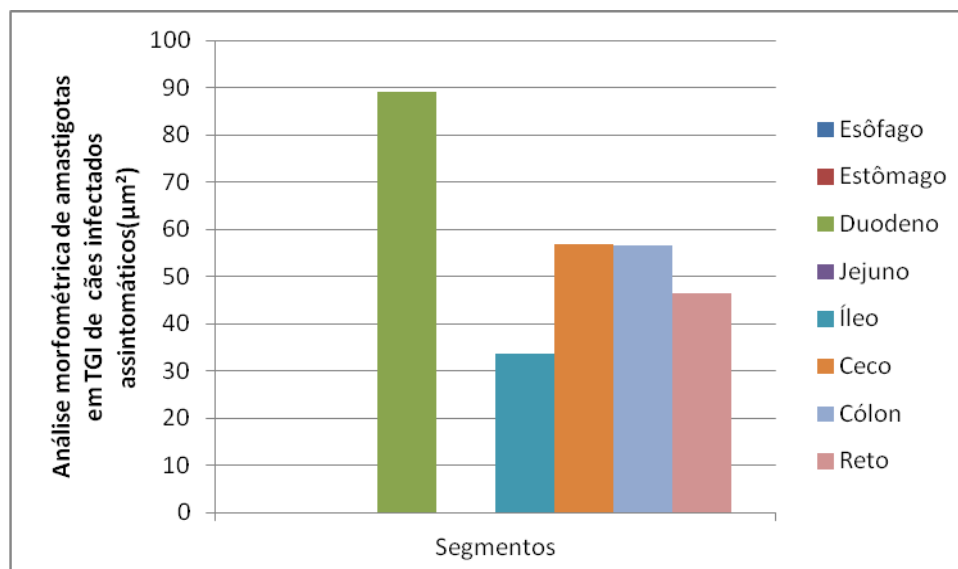
No grupo dos sintomáticos a região de maior carga parasitária foi o ceco, seguida pelo duodeno, cólon, estômago, reto e íleo (Gráfico 4).

Gráfico 4: Análise morfométrica da área de amastigotas imunomarcadas (μm^2) no TGI de cães infectados por *Leishmania (L.) chagasi* grupo sintomáticos (n=6):



Os cães do grupo assintomáticos apresentaram maior carga parasitária em duodeno seguidas de ceco, cólon reto e íleo (Gráfico 5).

Gráfico 5: Análise morfométrica da área de amastigotas imunomarcadas (μm^2) no TGI de cães infectados por *Leishmania (L.) chagasi* grupo assintomáticos (n=6):



6.6. Análise morfométrica dos mastócitos, células inflamatórias, epitélio intestinal e componentes da matriz extracelular no TGI de tecidos incluídos em GMA

A técnica de inclusão em GMA em tecido canino mostrou-se de grande importância para as avaliações do experimento, apresentando um melhor resultado para as avaliações quando utilizado técnicas rotineiras de histologia quando comparados com a inclusão em parafina. Colorações como H&E, azul de toluidina, Dominici, PAS mostraram-se de qualidade superiores quando comparado com as mesmas colorações em tecido incluídos em parafina. Com GMA, em todas as colorações foi possível identificar com facilidade as diferentes estruturas como mastócitos, muco, eosinófilos, epitélio, arquitetura tecidual do órgão, células inflamatórias com preservação do limite citoplasmático, formas amastigotas de *Leishmania*, bem como a excelente morfologia do tecido em qualquer uma das colorações utilizadas neste experimento (figuras 7, 8, 9 e 10). A avaliação pela resina permite observar a preservação dos limites citoplasmáticos das células e o arranjo tecidual. No que diz respeito ao processamento, obtivemos melhores resultados em todas as marcações quando utilizamos como fixador de tecidos o Carnoy's sendo todos os tecidos mantidos no fixador pelo tempo limite de 4 horas sob refrigeração (4°C). Amostras fixadas em formol tamponado 10%, não foram consideradas melhores quando comparadas a este fixador. Foi possível identificar que a inclusão em resina plástica em comparação com a parafina mostrou-se diversas vantagens bem como desvantagens.

Figura 7

Figura 8

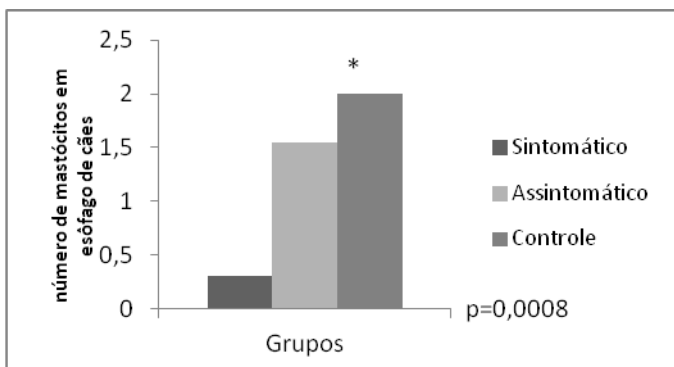
Figura9

Figura 10

6.7. Avaliação dos mastócitos:

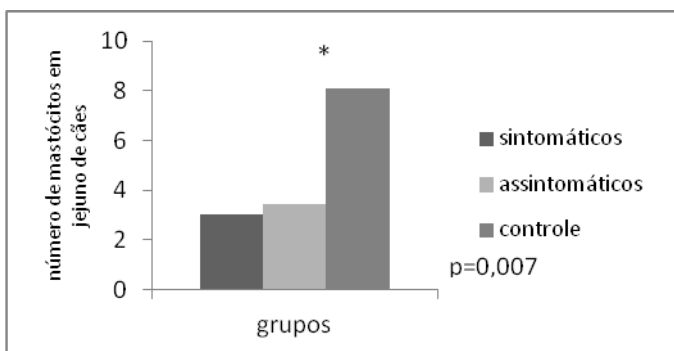
Observou-se diferença estatística na avaliação dos mastócitos em esôfago, jejuno, íleo, ceco e cólon. O esôfago de animais infectados foi significativamente menor quanto ao número de mastócitos que o grupo controle.

Gráfico 6: Análise morfométrica de mastócitos em esôfago nos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=6) e controle (3):



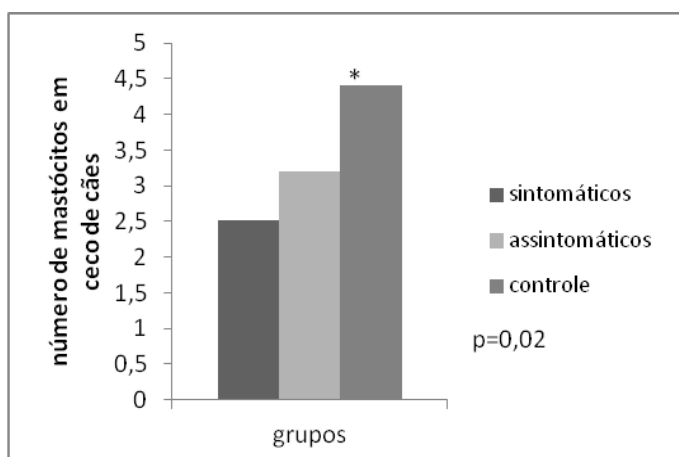
No jejuno observou-se que o grupo infectado foi significativamente menor do que o grupo controle no número de mastócitos:

Gráfico 7: Análise morfométrica de mastócitos em jejuno nos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=6) e controle (3):



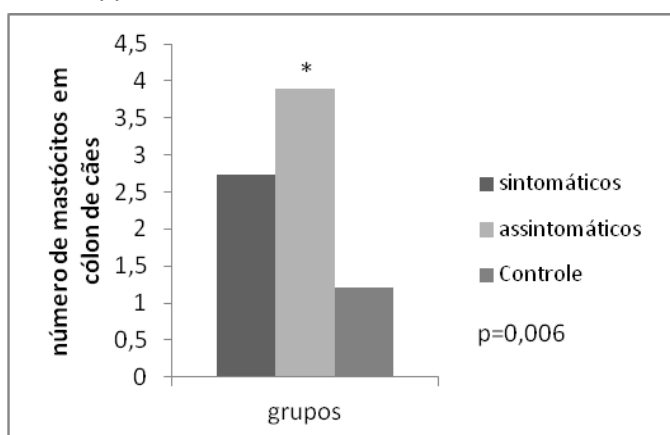
No ceco observou redução no número de mastócito do grupo sintomático em relação ao grupo controle.

Gráfico 8: Análise morfométrica de mastócitos em ceco nos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=6) e controle (3):



Já no Cólon observou-se aumento do número de mastócito do grupo assintomático em relação ao grupo controle

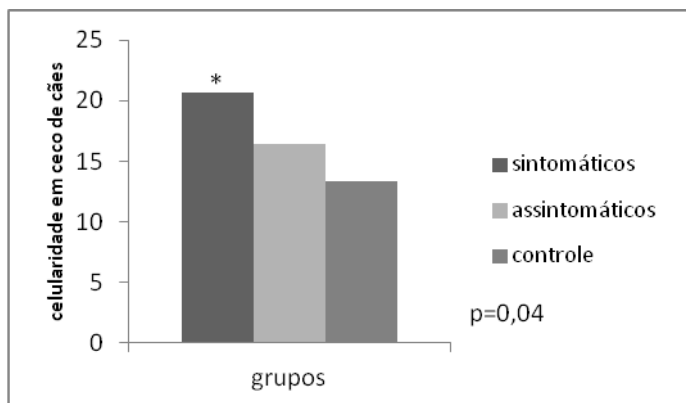
Gráfico 9: Análise morfométrica de mastócitos em cólon nos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=6) e controle (3):



6.8. Avaliação da células inflamatórias:

Observou-se nitidamente um aumento da celularidade em todos os segmentos dos animais infectados em comparação ao grupo controle, porém somente na região de ceco observou-se diferença estatística entre o grupo sintomático em relação ao grupo controle:

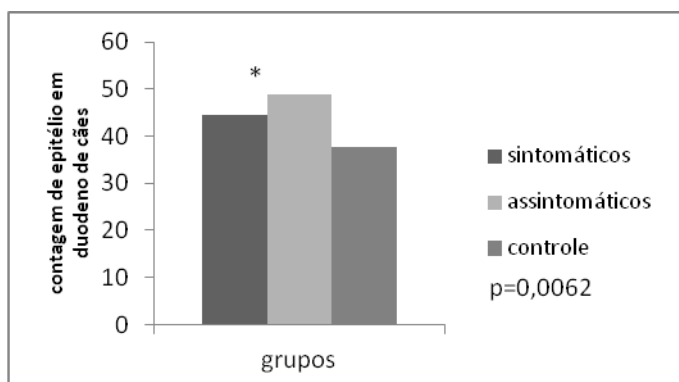
Gráfico 10: Análise morfométrica de células inflamatórias em ceco nos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=6) e controle (3):



6.9. Avaliação do epitélio:

Observou-se aumento do epitélio do duodeno dos cães infectados em relação ao grupo controle:

Gráfico 11: Análise morfométrica de epitélio intestinal em duodeno nos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=6) e controle (3):



6.10. Avaliação dos componentes da matriz extracelular:

Observou-se um aumento da quantidade de matriz extracelular nos grupos infectados em comparação com os grupos controle em esôfago, e uma diminuição significativa em jejuno e cólon:

Gráfico 12: Análise morfométrica dos componentes da matriz extracelular de esôfago nos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=6) e controle (3):

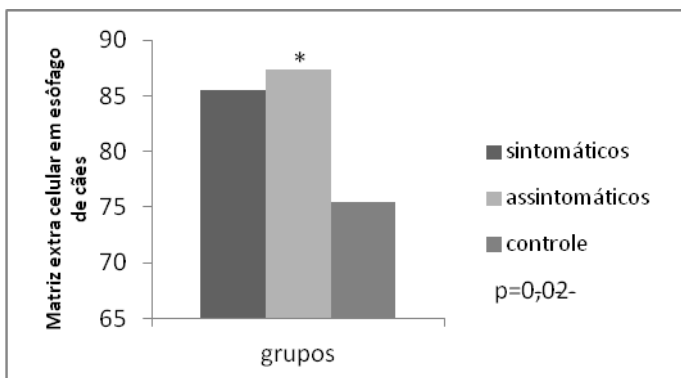


Gráfico 13: Análise morfométrica de componentes da matriz extracelular em jejuno nos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=6) e controle (3):

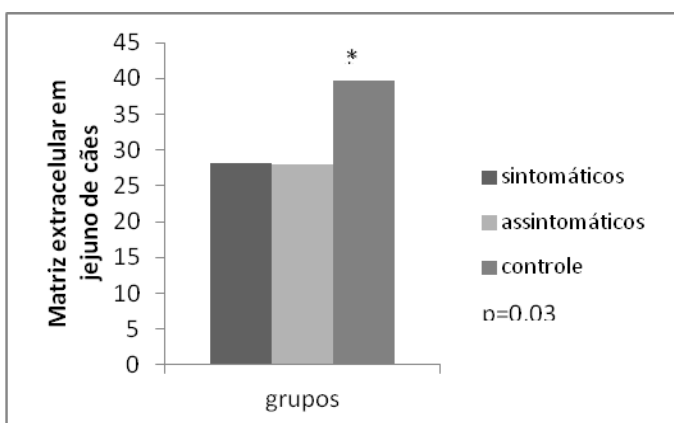
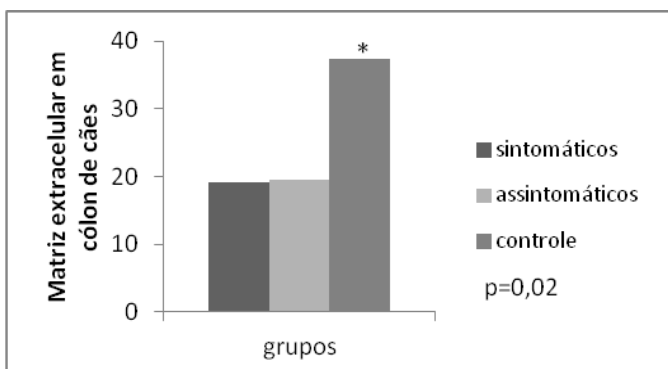


Gráfico 14: Análise morfométrica de componentes da matriz extracelular de cólon nos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=6) e controle (3):



7. Discussão:

Os achados clínicos encontrados no nosso trabalho vão de encontro com os achados mais comumente encontrados na literatura. Solano-Galego et al. (2004) descreveram que os achados clínicos comumente encontrados são as lesões de pele, linfadenomegalia, progressiva perda de peso, atrofia muscular, esplenomegalia, lesões oculares, onicogrifose vômitos e diarreia. Lima et al. (2007) observaram que a linfadenomegalia seguida da onicogrifose e patologias dermatológicas foram os achados mais comumente encontrados, semelhantes achados encontrados por Figueiredo et al. (2010). Em nosso trabalho, as lesões de pele (seborreia seca, alopecia, e onicogrifose) foram as alterações mais encontradas nos animais do experimento. Apesar da linfadenopatia, em nossos resultados, não aparecerem como uma das maiores alterações clínicas, Costa et al. (2008) relataram que a presença de lesões na pele possui relação direta com alterações encontradas em linfonodos. Os autores observaram que os cães que apresentavam lesões na pele da região da cabeça apresentavam maior parasitismo nos linfonodos parotídeos, os responsáveis pela drenagem da região, em comparação aos animais que não apresentavam lesões de pele da região. O autor ainda correlaciona os linfonodos regionais e suas áreas de drenagem linfática; linfonodos parotídeo, linfonodos cervicais e linfonodos submandibulares como os responsáveis pela drenagem linfática das regiões de pina de orelha e nariz; região caudal da pele e subcutâneo da cabeça; região externa do nariz, lábios, bochechas, pálpebras, glândula lacrimal e músculos superficiais da cabeça respectivamente. Alterações oculares como as blefarites foram encontradas em nosso trabalho. De acordo com Fulgêncio et al. (2007), as blefarites são alterações oculares comuns na LVC bem como uveítes, eritema palpebral, crostificação periocular e as conjuntivites. Leite et al. (2011) foram mais além e mostraram que o exame de PCR de um swab conjuntival em cães pode ser um método sensível e prático para detecção da doença. Em nosso experimento não foram observadas alterações como conjuntivites.

As alterações clínicas relacionadas ao TGI em ambos os cães naturalmente (Tryphonas et al., 1977; Ferrer et L., 1991; Toplu e Aydogan 2011) e experimentalmente (González et al., 1990) já foram descritos, sendo a diarreia crônica de intestino grosso, uma das alterações mais comumente encontrada. Ferrer et al. (1991) observou em dois cães uma diarreia crônica com presença de muco e

estrias de sangue que não respondiam ao tratamento com antibiótico terapia. Os animais apresentaram repetidos exames de fezes sem presença de parasitas intestinais e no exame bioquímico uma elevação das proteínas plasmáticas totais, quando foram indicados ao exame de colonoscopia. Durante a biópsia a mucosa do cólon apresentava hiperemia difusa com pequenas áreas de erosão. Na microscopia observaram corpos basofílicos em vacúolos citoplasmáticos de numerosos macrófagos. Como os animais viviam em área endêmica da LVC foi realizado o exame de imunohistoquímica da amostra de biópsia e a confirmação da doença veio com a visualização de formas amastigotas de *Leishmania*. Após a confirmação, um dos animais foi eutanasiado e o outro tratado para LVC apresentando melhora significativa do quadro de diarreia após dois meses do início do tratamento. O autor descreveu a diarreia crônica como sendo a primeira manifestação clínica da LVC apresentada pelos animais do estudo. González et al., 1990 descreveram alterações clínicas semelhantes, porém em animais experimentalmente infectados com *Leishmania infantum* que após aproximadamente 1 ano da indução da infecção, apresentaram diarreia intermitente caracterizada por presença de muco e sangue nas fezes, sendo que na macroscopia não foi identificada presença de parasitos intestinais nos segmentos avaliados. Em nosso estudo, a avaliação e controle quanto ao volume e frequência de defecações (que caracterizaria a diarreia) e presença de alterações nas fezes como de muco e sangue, não foram avaliados. Isto, pode ter ocorrido devido à dificuldade de acompanhar a defecação de cada animal individualmente, uma vez que os mesmos permaneceram por pouco tempo no canil e distribuídos em canis coletivos. Durante os exames clínicos, um animal apresentou moderada sensibilidade abdominal à palpação, porém o mesmo não apresentou quadro cínico sugestivo de diarreia ou vômito nem alterações macroscópicas evidente durante a necropsia que sugerisse uma correlação com a manifestação da doença no TGI. Esse resultado está de acordo com Adamama-Moraitou et. al (2007) que não observou essas manifestações (diarréias, vômitos) em animais naturalmente infectados com *Leishmania infantum* na Grécia. Entretanto os autores observaram através da biópsia de cólon, presença de hiperemia da mucosa, com áreas irregulares e/ou edema de mucosa e pequenas áreas de erosão da mucosa classificando como uma colite assintomática em cães infectados com *Leishmania*.

Em geral, durante a necropsia não se observou alterações macroscópicas em todos os segmentos do TGI dos animais estudados. Foi encontrado em cinco cães, mesmo após a vermifugação à presença de vermes intestinais (nematódeos e/ou cestódeos). Uma explicação possível para este achado é a deficiência da técnica de vermifugação, porém, Miró et al. (2007) ressaltaram que ainda não existem apresentações de vermífugos que apresentam eficácia frente a todos parasitos intestinais, e que é preciso rever as posologias e os fármacos de apresentação comercial. Keenan et al. (1984a) em estudo da LVC em cães experimentalmente infectados encontraram resultados positivos nos exames de fezes dos animais avaliados. Os animais apresentaram no exame de fezes presença de ovos de áscaris. Os autores não citam se os animais foram vermifugados.

Toplu e Aydogan (2011) observaram na macroscopia durante a necropsia de cães naturalmente infectados uma hemorragia no intestino delgado de dois cães com LVC crônica e em um cão assintomático, áreas de hemorragias puntiformes na superfície da mucosa intestinal. González et al. (1990) observaram um espessamento difuso da parede do cólon e reto de cães experimentalmente infectados. Semelhantemente, Silva et al. (2001) encontraram áreas de espessamento de ceco e cólon, com ocorrência de áreas de estenose sugestivas de fibrose e áreas sugestivas de enterite no intestino delgado de seis cães naturalmente infectados. Em nosso experimento, nenhuma alteração macroscópica foi encontrada. Hervás e colaboradores (1996) relataram em um chacal (*Canis aureus*) com leishmaniose visceral uma hemorragia gástrica com presença de formas amastigotas na mucosa do estômago. Trabalhos como de Adamama-Moraitou et al. (2007), Ferrer et al. (1991) mostraram que durante a colonoscopia os autores evidenciaram hiperemia de mucosa intestinal com áreas de pequenas erosões da mucosa em alguns animais do experimento.

Em nosso trabalho os animais infectados, visivelmente, apresentaram um aumento da celularidade da lâmina própria e submucosa dos segmentos do TGI (com exceção do esôfago) em comparação com os animais controles. Um exsudato de células mononucleadas foi observado, com predominância de plasmócitos, macrófagos, e linfócitose raros polimorfonucleares de permeio (neutrófilos e eosinófilos). Resultados semelhantes em animais naturalmente (Anderson et al., 1980; Longstaffe e Guy 1985; Ferrer et al., 1991; Silva et al., 2001;) e experimentalmente (Keenan 1984a; Keenan et al., 1984b; González et al., 1990)

infectados foram encontrados. Em geral macrófagos parasitados com morfologia peculiar (citoplasma hipocorado e vacúolos intracitoplasmáticos com formas amastigotas de *Leishmania*). Foi possível observar também, a presença de células epitelióides (macrófagos aumentados de tamanho, citoplasma hipocorado, núcleo vesiculoso com cromatina frouxa) e/ou células gigantes (fusão de macrófagos e monócitos jovens) do tipo corpo estranho normalmente associadas com infiltrado mononuclear. Ferrer et al. (1984b) e Adamama-Moraitou et al. (2007) também observaram macrófagos parasitados. Entretanto, o último autor citado observou em 90% dos seus animais o surgimento de piogranulomas, sendo que em nenhum caso foi constatado presença de colonização bacteriana intestinal. Toplu e Aydogan (2011) observaram juntamente com a presença do infiltrado mononuclear a presença de eosinófilos na mucosa do intestino e somente em um animal observou a presença de uma vasculite necrosante com poucos neutrófilos ao redor dos vasos de intestino, rins, bexiga e pulmões. Em nosso estudo não foram encontrados a presença de piogranulomas, sendo que em menor proporção encontradas células polimorfonucleares como neutrófilos.

A análise microscópica pôde revelar a presença de parasitismo, sem surgimento de grandes lesões como extensas erosões ou úlceras na mucosa intestinal. Todavia, na literatura, trabalhos como de González et al. (1990) descreveram mecanismo baseados na microscopia eletrônica correlacionando sinais clínicos como o surgimento da diarreia. Os autores consideraram que a inflamação crônica difusa encontrada em intestino grosso está associada com a presença das formas amastigotas dentro de macrófagos no intestino. Devido à estimulação antigênica do parasito ocorre uma hiperativação do sistema imune e como resultado, há infiltração de linfócitos e plasmócitos, juntamente com macrófagos parasitados. A perda de absorção intestinal que desencadeia a diarreia está caracterizada pela degeneração hidrópica formada nas células do epitélio intestinal que acarretam na lise da célula com desenvolvimento de microerosões e perda do epitélio de absorção. A diarreia parece ser formada a partir da perda de epitélio intestinal devido à degeneração epitelial e do processo inflamatório na mucosa do cólon, que são fatores descritos por Argenzio (1978). Isto explicaria fatores para perda de absorção de água e eletrólitos. O animal pode apresenta um infiltrado inflamatório sem a presença da diarreia, ou seja, o grau de parasitismo não tem relação direta com a intensidade da resposta inflamatória e surgimento de sinais clínicos. Em

nosso experimento, assim como descrito na literatura (Silva et al., 2001; Adamama-Moraitou et al., 2007; Toplu e Aydogan, 2011) não conseguimos estabelecer uma correlação precisa positiva ou negativa entre alterações microscópica (como infiltrado celular, parasitismo) e/ou presença de lesões que induzem surgimento de sinais clínicos.

Em nosso trabalho, podemos identificar qualitativamente que um aumento de celularidade discreto difuso foi avaliado em maior proporção nos nos segmentos do TGI do cães estudados. Um aumento de celularidade intenso e moderado tamberam foram encontrados. Toplu e Aydogan (2011) encontraram no TGI um aumento da celularidade moderado. Também foi observado aumento da celularidade intenso nos animais avaliados. O autor ainda descreve que o infiltrado foi restrito a lâmina própria adjacente a muscular da mucosa. Resultados semelhantes puderam ser visto por Silva et al., 2001 e em nosso trabalho, sendo que este aumento de celularidade foi visto também na submucosa. Entretanto em nosso experimento, observamos que em alguns casos de aumento intenso da celularidade, houve um extravasamento celular da camada submucosa para camada mucosa. Em alguns casos uma hiperplasia dos folículos linfoides associado à mucosa foi encontrado alterando a arquitetura da lâmina própria, que se desloca em direção ao lúmen. Este resultado está de acordo com Silva et al. (2001)

Assim como em outros órgãos já descritos na literatura como baço, fígado e pele (Tafuri et al., 1994; Gonçalves et al., 2003; Lima et al., 2007), a imunohistoquímica apresentou resultados satisfatórios nos segmentos do TGI em nosso trabalho. Silva et al. (2001) já haviam descrito a ineficácia da técnica de imprint's para visualização da carga parasitária em TGI de cães naturalmente infectados.. Esta técnica apresentou baixa sensibilidade, sendo difícil até mesmo a visualização de 100 núcleos de célula inflamatória por campo para caracterizar a contagem. Ferrer et al. (1991) após observar a marcação do parasita pela imunohistoquímica descreveram que não se conhece a razão pela qual o parasita se localiza na mucosa intestinal. Os autores ainda sugerem que para diagnóstico diferencial da LVC no intestino devem-se incluir infecções por Histoplasma, Salmonela, Yersinia e Prototheca e outros parasitas como Giardiase, Trichurys, Ancylostoma, Uncinaria, Entamoeba e Balantidium. Além deste existem as doenças inflamatórias do intestino grosso como as colites plasmocítica-linfocítica e as histiocítica colite ulcerativa. O autor ressalva que a utilização da biópsia para

detecção às vezes pode ser dificultada devido ao baixo índice de parasitas intestinais que dificultam a visualização pela H&E, sendo assim indicada a reação de imunohistoquímica para estes casos, pois mesma se mostrou bastante eficiente. Já Adamama – Moraitou et al. (2007), conseguiram observar resultados semelhantes utilizando a imunohistoquímica porém com repetidos exames de fezes negativos, excluindo assim a possibilidade de outras doenças intestinais.

Em nosso estudo, regiões de todo o TGI (com exceção do esôfago) foi possível identificar marcações pela imunohistoquímica. Silva et al. (2001) obteve resultados semelhantes e ainda conseguiu inferir que as marcações na camada mucosa tiveram uma tendência de maior concentração nas porções mais profundas, próximas à camada submucosa. Os autores ainda consideram que este fato pode ser mais bem compreendido levando-se em conta o tipo de circulação presente no TGI, que possibilita maior passagem para o interstício e, portanto, maior concentração de parasitos nas regiões onde estão presentes vasos de maior calibre. De fato, conseguimos encontrar que a maior tendência de concentração de marcações foi próxima à camada muscular da mucosa (na base da lâmina própria) somente em intestino grosso. Já na região proximal do TGI caracterizada por estômago, duodeno e íleo (onde se encontrou marcações positivas) as marcações pela imunohistoquímica foram encontradas em maior proporção (100% dos casos) próxima ao lúmen intestinal, difundidas entre as vilosidades. Platt et al. (2008) descreveram um estudo sobre macrófagos e regulação da resposta imune de mucosa em intestinos de camundongos e observaram que a microbiota presente no lúmen intestinal variam significativamente, sendo a porção jejunal (intestino delgado) quase estéril até a chegada no cólon descendente (intestino grosso) onde a microbiota comensal residente consiste em 10^{12} organismos por grama de conteúdo do lúmen intestinal. Com os nossos resultados e analisando este achado seria possível sugerir que no intestino delgado de cães, onde quase não existem microrganismos comensais no lúmen intestinal a *Leishmania* aparece difundida entre as vilosidades próximas ao lúmen intestinal. Já no intestino grosso, onde existe uma microbiota residente e onde o sistema imunológico regula essa microbiota, as formas do parasito apresentam-se isoladas da região, ficando concentrada próxima a base da lâmina própria como se esquivassem de onde o sistema imune tem maior atividade de reconhecimento e combate contra antígenos. MacDonald et al. (2011) descreveram que no TGI de seres humanos normais, que os linfócitos T constituem

um terço das células do intestino na lâmina própria, semelhante a proporção de plasmócitos produtores de IgA e também cita a presença de macrófagos e células dendríticas. O autor cita que no epitélio do intestino delgado contém aproximadamente um linfócito T para cada 10 células do epitélio intestinal, e já no cólon esta taxa pode chegar a um linfócito T para cada 20 células de epitélio intestinal. Com este resultado encontrado em seres humanos podemos sugerir que nos cães os achados de Silva et al. (2001), que encontrou a presença da maior carga parasitária em intestino grosso, tem uma correlação direta (apesar de não ter sido quantificado os tipos celulares, e de ainda não se ter estudos deste tipo com intestino de cães). Entretanto Nagashima et al. (1996) descreveram que macrófagos não estavam exclusivamente localizados abaixo da camada epitelial que cobre a lâmina própria da mucosa, conforme descrito nos seres humanos, mas estão distribuídos aleatoriamente por toda a lâmina própria do intestino humano. Esses achados levaram às perguntas se macrófagos no intestino de cães realmente atuam como primeira linha de defesa por causa de sua distância das camadas epiteliais.

Observou-se um intenso parasitismo em duodeno, ceco, cólon e reto em nossos estudos, porém, o achado do parasitismo no duodeno foi encontrado em maior proporção em um dos animais do grupo de cães infectados, que fez com que os valores se elevassem ao extremo, pois o mesmo encontrava-se extremamente parasitado. Tanto Ferrer et al. (1991) quanto Adamama- Moraitou et al. (2007) observaram presença de colites nos animais com e sem manifestação de sinais clínicos e a visualização do parasita em intestino grosso. Entretanto, nos dois experimentos somente foram realizadas biópsias (colonoscopia) para obtenção de amostras sendo que não se coletou amostras de intestino delgado. Silva et al. (2001) mesmo considerando em suas conclusões que a técnica de imprints em segmentos do TGI de não foi eficiente, o autor observou que nos animais infectados da região endêmica de João Pessoa apresentaram maior contagem de amastigotas por esta técnica na região de duodeno.

Com exceção do trabalho de Silva et al. (2001) não existem relatos na literatura quanto ao estudo das várias regiões do TGI de cães infectados com *Leishmania*. Em seu trabalho, os autores avaliaram seis regiões distintas de todo o TGI de cães, a saber estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco cólon. Em nossos trabalhos, fizemos um estudo semelhante neste aspecto, porém incluímos outras duas regiões: esôfago e reto. Em nosso trabalho não observamos marcações

positivas de *Leishmania* em esôfago e jejuno dos animais. Entretanto, Silva et al. (2001) observou em 27,7% de seus animais a presença de marcações positivas em jejuno.

Em nosso trabalho, observamos a marcação positiva na região de reto dos animais sendo considerada uma região relativamente de fácil visualização do parasito. Villanueva et al. (1994) em um paciente humano portador do vírus HIV descreveu um caso de esofagite causada por *Leishmania*. Outros trabalhos sobre LVH envolvendo alterações esofágicas causadas por *Leishmania* (Mediavilla Garcia et al., 1992; Guitérrez-Macia et al., 1995; Sollima et al., 1999) já foram descritos, entretanto em animais ainda não se possui relatos sobre a manifestação da doença na região de esôfago. Em nosso estudo não conseguimos encontrar presença de parasitos na região.

Realizando a contagem da carga parasitária nos segmentos estudados, Silva et al. (2001) observaram que as regiões visivelmente mais parasitadas foram ceco e cólon dos grupos de cães ambos sintomáticos e assintomáticos. Em nossos trabalhos, observamos que as regiões de duodeno, ceco, cólon e reto foram morfometricamente as mais parasitadas. Trabalhos envolvendo a LVH em duodeno já foram descritos (Álvarez-Nebreda et al., 2005; Mansedo González et al., 2006; Valenzuela et al., 2009;) entretanto, trabalhos deste sentido em cães ainda não foram relatados. Em nossos trabalhos um animal do grupo de cães infectados assintomáticos apresentou uma carga parasitária considerada incomum na região de duodeno. A carga parasitária apresentada por este animal foi superior à soma do mesmo segmento de todos os animais do grupo de cães sintomáticos. Silva et al. (2001) cita em seu trabalho que as marcações positivas na região de duodeno não passaram de 27,7%, entretanto foi encontrada áreas de necrose e enterite nesta região de alguns dos animais durante a análise macroscópica. Além da região de duodeno, em nossos trabalhos observamos que as regiões de intestino grosso (ceco, cólon e reto) foram as que mais comumente apresentaram cargas parasitárias elevadas. Este achado é similar ao encontrado por Silva et al. (2001).

A utilização da inclusão em resina de metacrilato em nosso experimento apresentou visivelmente resultados melhores quando comparada com a parafina (dados não publicados). Chiarini-Garcia (1996) descreveu que a inclusão de materiais biológicos em parafina, por usar xilol, parafina em altas temperaturas e pela dificuldade de obter cortes de pequena espessura, é um método muito

extrativo, grosseiro e demorado que prejudica a definição histológica do material em estudo, além de ser mais demorado seu processamento, pior resolução ao microscópio de luz entre outras. Em nosso experimento foram utilizados dois tipos de fixadores: a parafina para realização da técnica de imunohistoquímica, e a solução de Carnoy's para visualização dos mastócitos, H&E, Dominici, PAS. Amaral et al., 2004 comparou os efeitos dos fixadores formalina e Bouin em fragmentos de endométrio de equinos incluídos em resina plástica e concluiu que os constituintes celulares e teciduais observados em fragmentos incluídos em resina plástica, apresentam melhor resolução para estudos citológicos ao microscópio de luz quando são fixados em formalina. Em nosso experimento, os tecidos caninos incluídos em solução Carnoy's apresentaram melhores resultados para visualização de mastócitos em intestinos quando comparados à formalina. Foi possível ainda identificar que fixador em questão, apresentou resultados satisfatórios para as outras colorações, quando comparados às mesmas colorações em tecidos incluídos pela parafina fixados pela formalina (dados não publicados). Rocha e Chiarini – Garcia (2006) trabalharam com mastócitos de diversos tecidos em duas espécies de peixes e observaram que além do TGI ser o sistema que mais apresentou este tipo celular no estudo, que os mesmos podem apresentar heterogêneas características dentro da mesma espécie quando utilizados fixadores diferentes possivelmente devido a suas propriedades funcionais ou à sua sensibilidade aos fixadores. Em nosso trabalho a morfologia dos mesmos se manteve constante sem grandes alterações quanto as suas características quando utilizado o fixador Carnoy's.

Chiarini-Garcia (2006) ainda descreve nos protocolos da coloração de H&E a utilização do álcool acidulado (1ml de ácido clorídrico PA para 99ml de álcool 70%) para diferenciação como item opcional à técnica. Em nosso experimento, obtivemos melhores resultados quando não utilizamos o álcool acidulado, ou quando utilizamos o mesmo usando uma diferenciação extremamente rápida, ou em concentrações menores. Em nosso trabalho as colorações de H&E, azul de toluidina com borato de sódio, dominici e PAS em tecido canino fixados com solução Carnoy's e incluídos em resina plástica de metacrilato mostraram-se mais eficazes quando realizamos pequenas alterações nos protocolos (ver anexos) descritos por Chiarini-Garcia (1996).

Em nosso experimento, observamos com facilidade mastócitos difundidos pela mucosa e submucosa de todo o TGI dos cães do experimento. Foi possível

observar que os animais infectados apresentaram uma menor quantidade de mastócitos que o grupo controle com exceção de cólon e reto que apresentaram um número de mastócitos maior que o grupo controle. Há poucos relatos sobre a distribuição de mastócitos e seus subtipos do TGI de cães (Kube et al, 1998.;Locher et al, 2001;. Noviana et al, 2004). Figueiredo et al. (2009) observou que os mastócitos na pele de cães não infectados era maior quando comparados aos cães infectados com LVC. Kleinschmidt et al., 2007 observaram em animais saudáveis que o número de mastócitos assim como de linfócitos T CD3+ e macrófagos da mucosa intestinal declinam de acordo com a idade do cão.

A avaliação morfológica de células inflamatórias com exceção do esôfago foi visivelmente maior nos animais infectados comparados com animais controles. Diversos trabalhos na literatura descrevem aumento de celularidade intestinal (Anderson et al., 1980; Longstaffe e Guy 1985; Ferrer et al., 1991) porém somente Silva et al. (2001) fez uma avaliação qualitativa das células inflamatórias dos segmentos em um estudo sistemático. Nossos resultados vão de encontro aos achados destes autores, em nosso trabalho a técnica morfológica para a contagem da celularidade mostrou-se muito eficaz assim como descrito por Lima et al. (2007). Os trabalhos que utilizaram animais experimentalmente infectados com *Leishmania* (González et al., 1990; Keenan et al., 1984b) também obtiveram resultados semelhantes, porém qualitativos.

O TGI é um dos sistemas que possuem grande relação com meio externo, e para a exposição a um grande número de antígenos alimentares e microbianos requer um complexo e preciso mecanismo de regulação da resposta imune com diferentes tipos de células da mucosa que resultam na indução manutenção da homeostase intestinal. Defeitos neste equilíbrio homeostático podem prejudicar este mecanismo e levar à inflamação intestinal crônica (MacDonald et al., 2011). Ferrer et al. (1991) consideram como diagnóstico diferencial as doenças inflamatórias do intestino grosso como as colites plasmocítica-linfocítica e as colite ulcerativa.

A análise morfológica do epitélio mostrou que os animais infectados apresentaram um aumento das células epiteliais na região de duodeno em comparação com o grupo controle. González et al. (1990) descreveram alterações degenerativas na superfície epitelial da mucosa de intestino grosso desenvolvendo em microerosões da mucosa do cólon. Curiosamente MacDonald et al. (2011) em seres humanos descreveram o papel do epitélio como importante na regulação da

homeostase e como fator pro-inflamatório. O autor descreve que o epitélio do intestino delgado secreta CCL25 e CCR9.. Durante a inflamação gastrointestinal, as células epiteliais liberam quimiocinas como CXCL8, que ajuda a atrair granulócitos para o tecido. Além disto, o autor descreve que em seres humanos saudáveis, as células epiteliais do TGI produzem TGF- β , que pode reduzir a respostas pró-inflamatórias das células T na lâmina própria. De fato, em nossos experimentos, todos os animais infectados apresentaram um aumento da celularidade inflamatória em um ou mais segmentos do TGI.

8. Conclusões:

A utilização da inclusão de material biológico (TGI de cães) em resina plástica de metacrilato, mostrou resultados satisfatórios para as colorações rotineiras de histologia, padronizadas de acordo com o nosso projeto.

A morfologia tecidual apresenta maiores vantagens sobre a inclusão em parafina, preservando os limites citoplasmáticos e a arquitetura tecidual.

A resina plástica de metacrilato em tecidos caninos apresentou a vantagem de acelerar a fase de processamento e coloração das lâminas não sendo necessário desidratar o tecido realizando a passagem pelos álcoois nem realizar a sua hidratação posteriormente a etapa de coloração. Ainda, a resina mostrou-se eficaz quanto a preservação do tecido aderido a lâmina para imunohistoquímica não sendo necessário utilizar lâminas em gelatina especial para realizar a técnica.

A solução de Carnoy's apresentou excelente eficácia como fixador para todas as colorações rotineiras como H&E, azul de toluidina, dominici, PAS em segmentos do TGI de cães especialmente quando o material foi mantido no período de até 3 horas sob refrigeração (4°C).

A LVC apresenta diversos sinais clínicos, sendo as alterações dermatológicas consideradas comuns na doença. Entretanto alterações clínicas no TGI não são facilmente encontradas apesar da presença do parasito no mesmo ser comumente encontrada.

Não é possível estabelecer uma relação positiva entre o surgimento de sinais clínicos, com as alterações microscópicas e a própria presença do parasito nos segmentos de todo o TGI.

O aumento da celularidade no TGI em cães com LVC é um achado comum na doença.

O aparecimento da elevada carga parasitária em intestino delgado (duodeno) de um dos cães do experimento é considerado um achado incomum sendo que a presença de elevadas cargas parasitárias são comumente encontradas em intestino grosso (ceco, cólon e reto).

Apesar da contagem morfométrica do epitélio intestinal ser feito pela técnica de proporção volumétrica, a mensuração do tamanho e espessura das vilosidades/criptas intestinais, juntamente com este método parece ser melhor para qualificar o órgão quanto a alterações como hipertrofia/atrofia. Da mesma forma a avaliação da matriz extracelular no intestino, deve ser avaliada com outras técnicas de colorações bem como com um número maior de animais.

9. Referência Bibliográfica:

ADAMAMA-MORAITOU KK, RALLIS TS, KOYTINAS AF, TONTIS D, PLEVRAKI K, KRITSEPI M. **Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study.** *Am J Trop Med Hyg.* Jan; 76(1):53-7. 2007

ALONSO, M. J., E. MUNOZ, et al. **Duodenal leishmaniasis diagnosed by biopsy in two HIV-positive patients.** *Pathol Res Pract*, v.193, n.1, p.43-7; discussion 49-50. 1997.

ALVAREZ-NEBREDA ML, ALVAREZ-FERNÁNDEZ E, RADA S, BRAÑAS F, MARAÑÓN E, VIDÁN MT, SERRA-REXACH JA. **Unusual duodenal presentation of leishmaniasis.** *J Clin Pathol.* Dec;58(12):1321-2, 2005

AMARAL D., CHIARINI-GARCIA, H. ., VALE FILHO V.R. , ALLEN, W.R **Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias do endométrio de éguas após inclusão em resina plástica.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.1, p.7-12, 2004

ANDERSON, D. C., R. G. BUCKNER, ET AL. **Endemic canine leishmaniasis.** *Vet Pathol*, v.17, n.1, Jan, p.94-6. 1980.

ARAUJO SA, NASCENTES QUEIROZ TC, DEMAS ALVARES CABRAL MM. **Colonic leishmaniasis followed by liver transplantation.** *Am J Trop Med Hyg*;83(2):209. No abstract available, 2010

ASHFORD, R. W. **The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses.** *Int J. Parasitol.*, v.30, n12-13, 11/2000, p.1269-1281, 2000.

BEJARANO EE, URIBE S, ROJAS W, VELEZ ID **Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 27–28.(2001)

BERN C, MAGUIRE JH, ALVAR J **Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis.** *PLoS Negl Trop Dis* 2: e313. (2008)

CALIARI, M. V. **Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes.** Belo Horizonte: *Editora UFMG*, v.149. 1997

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

CHANG KP. **Leishmania infection of human skin fibroblasts in vitro: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation.** *Am J Trop Med Hyg.* Nov;27(6):1084-96, 1978.

CHIARINI-GARCIA, H. **Inclusão de material biológico em resina plástica.** *Belo Horizonte: UFMG*, 1996.

COSTA MM, LIMA WG, FIGUEIREDO MM, MICHALICK MS, TAFURI WL, TAFURI WL. **Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions.** *Vet Pathol.* Sep;45(5):613-6, 2008.

COSTA-VAL, A. P., R. R. CAVALCANTI, et al. **Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis infectivity.** *Vet J*, v.174, n.3, Nov, p.636-43, 2007.

DENVES, B.A. **Leishmaniose: Histórico, etiologia, epidemiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle.** *PubVet*, v2, N13, Mar5, 2008.

DOS SANTOS SO, ARIAS JR, DE PAIVA HM, FURLAN MB, FERREIRA WF. **The presence of Lutzomyia longipalpis in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is Lutzomyia cruzi. Corumba, Mato Grosso do Sul State.** *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 33–634.2003

EVANS L. **Disparada da leishmaniose.** *Estado de Minas*, 5 de julho. 2011

FELICIANGELI MD, RODRIGUEZ N, DE GUGLIELMO Z, RODRIGUEZ A) **The reemergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites.** 6: 113–120., 1999.

FERRER, L., B. JUANOLA, et al. **Chronic colitis due to Leishmania infection in two dogs.** *Vet Pathol*, v.28, n.4, Jul, p.342-3. 1991.

FIGUEIREDO MM, MOURA EP, COSTA MM, RIBEIRO VM, MICHALICK MS, TAFURI WL, Tafuri WL. **Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi.** *Histol Histopathol*. Jul;25(7):877-87. 2010

FREITAS, L.A.R., SILVA, L.R., BADARÓ, R.A. **A patologia intestinal no calazar: estudo morfológico de 31 fragmentos de mucosa jejunal, obtidas por biópsis perorais de 20 crianças.** *Rev.Med.Minas Gerais*, Belo Horizonte, v.5, n.2, supl. 2. P. 17, abr./jun. 1995. (resumo)

GENARO, O. **Leishmaniose visceral experimental.** (Doutorado), Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 202p. 1993

GONÇALVES R, TAFURI WL, MELO MN, RASO P, TAFURI WL. **Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi: a histopathological and morphometric study.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* May-Jun;45(3):153-8. Epub 2003 Jul 8. 2003

GONZALEZ, J. L., M. L. FERMIN, et al. **Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis.** *Zentralbl Veterinarmed B*, v.37, n.5, Jul, p.377-82. 1990.

GRIMALDI JR, G. E R. B. TESH. **Leishmanioses of the New World: Current concepts and implications for future research.** *Clin. Microbiol. Rev*, v. 6, . p.230-250. 1993.

GUERIN PJ, OLLIARO P, SUNDAR S, BOELAERT M, CROFT SL, DESJEUX P, WASUNNA MK, BRYCESON AD. **Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda.** *Lancet Infect Dis.* Aug;2(8):494-501. 2002

GUTIÉRREZ-MACÍAS A, ALONSO-ALONSO JJ, AGUIRRE-ERRASTI C. **Esophageal leishmaniasis in a patient infected with the human immunodeficiency virus.** *Clin Infect Dis.* Jul;21(1):229-30., 1995.(Resumo)

HAMOUR, A. A., R. SKELLY, et al. **Visceral leishmaniasis (Kala-azar) in two patients with HIV-1 infection: atypical features and response to therapy.** *J Infect*, v.36, n.2, Mar, p.217-20. 1998.

HERVÁS, J., A. MENDEZ, ET AL. **Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (Canis aureus).** *Vet Rec*, v.139, n.12, Sep 21, p.293-5. 1996.

HERWALDT, B. L. **Leishmaniasis.** *Lancet*, v.354, n.9185, 10/2/1999, p.1191-1199.1999

KEENAN CM, HENDRICKS LD, LIGHTNER L, WEBSTER HK, JOHNSON AJ. **Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology.** *Vet Pathol.* Jan;21(1):74-9. 1984a.

KEENAN, C. M., L. D. HENDRICKS, ET AL. **Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology.** *Vet Pathol*, v.21, n.1, Jan, p.80-6. 1984b.

KUBE P, AUDIGÉ L, KÜTHER K, WELLE M. **Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques.** *Histochem Cell Biol.* Aug;110(2):129-35. 1998

LAGUNA, F., J. GARCIA-SAMANIEGO, ET AL. **Gastrointestinal leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients: report of five cases and review.** *Clin Infect Dis*, v.19, n.1, Jul, p.48-53. 1994a.

LAGUNA, F., V. SORIANO, ET AL. **Gastrointestinal leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus.** *Rev Clin Esp*, v.194, n.6, Jun, p.510-1. 1994b.

LEITE RS, MENDES VC, FERREIRA AL, ANDRADE AS. **The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs.** *Rev Bras Parasitol Vet.* Jan-Mar;20(1):36-41. 2011

LIMA, W.G.; OLIVEIRA, P. S.; CALLIARI, M. V. ET AL. **Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*.** *Vet Immu. and Immunopathol.*, v.117, n.1-2, p.129-136, 2007.

LOCHER C, TIPOLD A, WELLE M, BUSATO A, ZURBRIGGEN A, GRIOT-WENK ME. **Quantitative assessment of mast cells and expression of IgE protein and mRNA for IgE and interleukin 4 in the gastrointestinal tract of healthy dogs and dogs with inflammatory bowel disease.** *Am J Vet Res.* Feb;62(2):211-6. 2001

LONGSTAFFE, J. A. & GUY, M., W. **Leishmaniasis in dogs.** *Vet Annu.*, v. 25, p. 358-367, 1985

MACDONALD TT, MONTELEONE I, FANTINI MC, MONTELEONE G. **Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine.** *Gastroenterology.* 2011 May;140(6):1768-75. Review.

MASEDO GONZÁLEZ A, BARBERO ALLENDE JM, PÉREZ-CARRERAS M, GARRIDO M, LIZASOAIN M, SOLÍS HERRUZO JA. **Intestinal leishmaniasis and Sézary syndrome: endoscopic diagnosis.** *Gastroenterol Hepatol.* Nov;29(9):546-50. Span. 2006

MAURICIO IL, HOWARD MK, STOTHARD JR, MILES MA. **Genomic diversity in the Leishmania donovani complex.** *Parasitology.* Sep;119 (Pt 3):237-46. 1999

MEDIAVILLA GARCÍA JD, LOPEZ-GÓMEZ M, CORRALES TORRES AJ, ORTIZ FLORES F, JIMÉNEZ-ALONSO J. **Esophago-gastric leishmaniasis in a patient with HIV infection.** *Rev Clin Esp.* 1992 Oct;191(6):335-6.(Resumo)

MIRÓ G, MATEO M, MONTOYA A, VELA E, CALONGE R. **Survey of intestinal parasites in stray dogs in the Madrid area and comparison of the efficacy of three anthelmintics in naturally infected dogs.** *Parasitol Res.* Jan;100(2):317-20. Epub 2006 Aug 17. 2007

MUIGAI, R., GATEI, D G., SHAUNAK, S ET. AL..**Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis.***Lancet*, v. 27,p.476-479, ago, 1983.

NAGASHIMA R, MAEDA K, IMAI Y, TAKAHASHI T **Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function.** *J Histochem Cytochem.* Jul;44(7):721-31. 1996

NIETO, C. G.; GARCÍA-ALONSO, J. M.; REQUENA, J. M. et al. **Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of Leishmania infantum: correlation with disease progression in canine**

experimental leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.67, n.2, p.117-130, 1999

NOVIANA D, MAMBA K, MAKIMURA S, HORII Y. **Distribution, histochemical and enzyme histochemical characterization of mast cells in dogs.** *J Mol Histol.* Feb;35(2):123-32. 2004

PEARSON, R. D. & SOUSA, A. Q. **Clinical spectrum of leishmaniasis.** *Clin. Infect. Disc.*, v.22, p. 1-13, 1996

PEÑA MT, NARANJO C, KLAUSS G, FONDEVILA D, LEIVA M, ROURA X, DAVIDSON MG, DUBIELZIG RR. **Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog.** *J Comp Pathol.* Jan;138(1):32-9. Epub 2007 Nov 28. 2008

PINHO JM, CARDOSO FC, LOPES DO, PINHEIRO CS, CALIARI MV, OLIVEIRA FM, LEITE LC, OLIVEIRA SC. **Immunization with Smlg, a novel tegument protein from *Schistosoma mansoni*, fails to induce protection in mice but reduces liver pathology.** *Parasitology* Jun;137(7):1079-88. Epub 2009 Oct 16. . 2010

PLATT AM, MOWAT AM. **Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine.** *Immunol Lett* Aug 15;119(1-2):22-31. Epub 2008 Jul 2. Review. . 2008

REIS AB, TEIXEIRA-CARVALHO A, GIUNCHETTI RC, GUERRA LL, CARVALHO MG, MAYRINK W, GENARO O, CORRÊA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA. **Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*.** *Clin Exp Immunol.* Nov;146(2):303-11. 2006.

ROCHA J. S., CHIARINI-GARCIA H., **Mast cell heterogeneity between two different species of *Hoplias* sp. (Characiformes: Erythrinidae): Response to fixatives, anatomical distribution, histochemical contents and ultrastructural features.** *Fish & Shellfish Immunology* 22 218e229.2007

ROMERO GA, BOELAERT M. **Control of visceral leishmaniasis in latin america- a systematic review.** *PLoS Negl Trop Dis.* Jan 19;4(1):e584. 2010 Review

ROIG P, CUADRADO JM, BENÉITEZ C, MAYOL MJ, LÓPEZ M, NAVARRO V, NIETO A, BERNACER B. - **Visceral leishmaniasis located in the intestines in patients with human immunodeficiency virus infection: a report of 2 cases.***Rev Clin Esp.* Apr;192(6):271-3. 1993.Review.

ROSENTHAL, P. J., R. E. Chaisson, et al. **Rectal leishmaniasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome.** *Am J Med,* v.84, n.2, Feb, p.307-9. 1988.

ROSS, R. (1) **Note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies.** *Brit. Med. J,* v.2, p.1261-1401. 1906.

RUSSELL DG, ALEXANDER J **Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes.** *J Immunol.* Feb 15;140(4):1274-9. Erratum in: *J Immunol* 1988 Apr 15;140(8):2858. 1988

SILVA, F. L. **Estudo histopatológico e imuno-histoquímico do trato gastrintestinal de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi. (Dissertação de Mestrado).** *Clinica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,* 41 p. 2001.

SILVA, F. L., W. L. TAFURI, ET AL. **Histopathological and immunohistochemiscal study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi: a case report.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária,* v.54, n.4, p.340-344. 2002.

SLAPPENDEL, R. J. **Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands.** *Vet Q,* v.10, n.1, Jan, p.1-16. 1988.

SOLANO-GALEGO, L.; Fernandez-Bellon, H.; Morell, P.; Fondevila, D.; Alberola, J.; Ramis, A.; Ferrer, L. **Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs.** *J Comp Pathol*, v.130, n.1, p.7-12, 2004.

SOLLIMA S, PIZZUTO M, BONETTO S, RAVASIO L, TOSONI A, VAGO L, CORBELLINO M, ANTINORI S. **A case of oesophageal leishmaniasis indicating visceral leishmaniasis in a patient with AIDS.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Oct;18(10):752-5. 1999 (Resumo)

TAFURI, W., L., **leishmaniose visceral em cães naturalmente e experimentalmente infectados: histopatologia e estudo imunocitoquímico dos receptores do tipo 3 (CR3- CD11b/CD18) e 4 (CD11c/CD18) do complemento e dos antígenos de histocompatibilidade da classe II no fígado e órgãos linfoides.** (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995, 207p.

TAFURI, W. L., R. L. Santos, et al. **An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues.** *J Immunol Methods*, v.292, n.1-2, Sep, p.17-23. 2004.

TOPLU N, AYDOGAN A. **An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis.** *Parasitol Res*, DOI10.1007/s00436-011-2345-0, 2011

TRYPHONAS L, ZAWIDZKA Z, BERNARD MA, JANZEN EA. **Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations.** *Can J Comp Med*. Jan;41(1):1-12. 1977

VALENZUELA E. J, B. M. R, RODRIGO A. JL, PEÑARANDA G. C, TORROBA A, MOLINA M. J, CARBALLO A. F. **Duodenal leishmaniasis in a HIV patient.** *Rev Esp Enferm Dig*. Jan;101(1):60-2. 2009

VIANA, F.A.B. et al. **Aspectos clínicos do entrópico de desenvolvimento em cães da raça Shar Pei.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Abr, vol.58, no.2, p.184-189. 2006

VILLANUEVA, J. L., J. TORRE-CISNEROS, ET AL. **Leishmania esophagitis in an AIDS patient: an unusual form of visceral leishmaniasis.** *Am J Gastroenterol*, v.89, n.2, Feb, p.273-5. 1994.

WERNECK GL, RODRIGUES L, SANTOS MV, ARAUJO IB, MOURA LS, et al. **The burden of Leishmania chagasi infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil.** *Acta Trop* 83: 13–18. 2002

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). TDR diseases/Diseases current portfolio. Disponível em <http://ww.who.int/tdr/publications/pdf/pr13/leis.pdf/pr13 /leish.pdf>> Acesso em 06 dezembro 2006.

ZERPA O, ULRICH M, BORGES R, RODRIGUEZ V, CENTENO M, ET AL. **Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela.** *Rev Panam Salud Publica* 13: 239–245.2003

Anexo 1

Processamento, infiltração e inclusão em GMA.

- **Desidratação:** fragmento possui grande quantidade de H₂O;

Realizar desidratação 50%, 70%,80%, 90%, 100% por 30 minutos (depende do tamanho da peça qual tipo de tecido o tempo é variável);

-**Infiltração:** Após passagem nos álcoois realizar a primeira infiltração(pode ser feita a temperatura ambiente ou a 4C) por 4 – 12horas sob agitação se possível utilizar agitador(tecido irá ficar com água) esta primeira resina é descartável.

Solução infiltração:

50ml BASIC RESIN/Liquid

+

1 packet (0.5g) ACTIVATOR

Posteriormente a segunda inclusão será feita com a mesma solução da primeira infiltração. Por 12 – 24horas à 4C ESTA RESINA PODE SER UTILIZADA DA PRÓXIMA VEZ COMO SOLUÇÃO DE PRIMEIRA INFILTRAÇÃO. Este material pode ficar estocado em geladeira até a hora da inclusão.

-**Inclusão:** Solução de inclusão:

15ml SOLUÇÃO DE INFILTRAÇÃO NOVA

+

1ml HARDENER

-Inclusão: Realizar a inclusão sempre no BANHO DE GELO, pois polimerização é rápida (reação exotérmica). Sempre preparar tecidos, identificação das formas antes de realizar a solução de inclusão. Cobrir caixa plástica com papel alumínio ou plástico e aguardar.

Obs: observar tamanho do fragmento para não ultrapassar o tamanho da navalha de vidro e a sua posição para evitar cortes transversais de tecido.

Anexo 2

HEMATOXILINA-EOSINA – GMA (Adaptado de Chiarini-Garcia 1996)

Reagentes -

Hematoxilina de Harris

- hematoxilina 1g
- etanol a 95% 10 ml
- alumínio de potássio 20g
- água destilada 200 ml
- óxido de mercúrio 0,5g

Eosina aquosa - segundo Lison

- eosina amarelada 1g
- álcool absoluto 10 ml
- bicromato de potássio 0,5g
- água destilada 80 ml
- solução saturada de ácido pícrico .. 10 ml

Solução de alumínio de ferro a 2%

- alumínio de ferro 2g
- água destilada 100 ml

Solução de álcool acidulado

- ácido clorídrico 1 ml
- álcool etílico 70% 200 ml

Coloração

- a. Lavar em água corrente 5´
- b. Solução de alumínio de ferro a 2% 10´
- c. Lavar em água corrente 5´
- d. Corar com hematoxilina 3 a 15´
- e. Lavar em água corrente 10´
- f. diferenciar com álcool acidulado – EXTREMAMENTE RÁPIDA

- g. Lavar em água corrente 5´
- h. Corar com eosina 30" a 2'
- i. Lavar em água corrente até retirar o excesso de corante
- j. Secar em estufa ou na temperatura ambiente
- k. Montar

OBSERVAÇÕES:

A utilização do álcool acidulado é opcional, se o tecido for de baixa espessura pular esta etapa.

AZUL DE TOLUIDINA-BORATO DE SÓDIO GMA– (Adaptado de Chiarini-Garcia 1996)**2.1. Reagentes -**

Solução corante

- azul de toluidina O 0,5g
- borato de sódio 1g
- água destilada 99 ml

Dissolver 1g de borato de sódio em 99 ml de água destilada e, em seguida, acrescentar 0,5g de azul de toluidina O. Agitar e filtrar em papel de filtro. Conservar em vidro escuro.

2.2. Coloração -

- a. Lavar em água corrente 2'
- b. Corar com azul de toluidina-borato 15" a 1'
- c. Lavar em água corrente até diferenciação e a retirada do excesso de corante da resina.
- d. Secar à temperatura ambiente.
- e. Montar

OBSERVAÇÕES:

- o tempo de coloração é variável conforme o tecido, a espessura de corte e o tipo de fixador empregado.

ÁCIDO PERIÓDICO-SCHIFF (PAS) (Adaptado de Chiarini-Garcia 1996)

Reagentes -

Solução de ácido periódico a 0,5%

- ácido periódico 0,5 g
- água destilada 100 ml

Reativo de Schiff

- fucsina básica 1 g
- bissulfito de sódio 1 g
- ácido clorídrico 1N 10 ml
- água destilada quente 200 ml

Bissulfito de Sódio

- metabissulfito de sódio a 10% 6 ml
- ácido clorídrico 1N 5 ml
- água destilada 100 ml

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

- Preparo do HCl 1N = 8,35 ml HCl + 91,65 ml de água (HCl com densidade 1,192,

PM

de 36,46 e a 36,1%)

Coloração

- a. Lavar em água destilada 5´
- b. Ácido periódico a 0,5% 10 a 20´ .
- c. Lavar em água destilada 5´
- d. Reativo de Schiff 30 a 60´
- e. Lavar em 1 banho de bissulfito de sódio 1% .. 3´
- f. Lavar em água corrente 30´
- g. Corar com hematoxilina (opcional) 5´

- h. Lavar em água corrente 30´
- i. Secar em estufa ou à temperatura ambiente
- j. Montar

Os tempos necessários nas etapas b, d e g variam conforme o tecido, o fixador e a espessura de

Corte.

Anexo 3

PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA REAÇÃO STREPTAVIDINA-PEROXIDASE

1- Desparafinar (se for o caso) – 15 min. (Xilol I e II) Bateria Rosa

Hidratar os cortes em álcool (3 min em cada álcool Absoluto II ao 70%).

OBS: Lâminas Criostato começar nos álcoois

Para 1 litro de PBS 1X

100mL de PBS concentrado e 900mL de água destilada

2- Dar 01 banho de PBS (1X) – 5 min.

3 – Bloqueio da Peroxidase Endógena :

Colocar os cortes em solução de água oxigenada (H₂O₂) 30 volumes por 20 a 30 min.

H₂O₂ 30v ----- 3,5 ml ----- 7,0 ml ----- 10 ml

PBS -----100 ml ----- 200 ml ----- 250 ml

4- Dar 03 banhos de PBS (1X) – 5 min. cada.

5- Bloqueio dos Sítios de Ligações Antigênicos Inespecíficos :

Enxugar as lâminas em torno dos cortes (usando papel higiênico).

Pingar SORO NORMAL DE CABRA (1: 50) Incubar em câmara úmida - 30 min. à temperatura ambiente.

ou

leite desnatado 6% (12g em 200ml de PBS) – 1o Bloqueio.

6 - Dar 01 banho de PBS 1X

7- Enxugar o excesso e pingar o soro primário: SORO DE CÃO NATURALMENTE INFECTADO (SNI-CÃO) 1: 100 .

Incubar em câmara úmida a 40C (geladeira) por 16 a 18 horas (“overnight”).

8- Dar 3 banhos de PBS (1X) – 5 min. cada.

9- Enxugar o excesso de PBS e pingar o soro secundário : SORO DO KIT DAKO AMARELO SEM DILUIR e incubar por 20 min.

10- Dar 3 banhos de PBS (1X) – 5 min. cada.

11 - Enxugar o excesso de PBS e pingar o soro terciário: SORO DO KIT DAKO LARANJA (streptavidina peroxidase conjugada) SEM DILUIR e incubar por 20 min.

12- Dar 2 banhos de PBS (1X) – 5 min. cada.

13- Revelação :

PBS	_____	200 ml	_____	250 ml
DAB	_____	50 mg (= 0,050 g)	_____	60 mg
H2O2.40v	_____	400 \square l	_____	500 \square l

OBS: Homogeneizar bem o DAB antes de filtrar e Filtrar a Hematoxilina

Incubar os cortes por 5 min. (controle ao microscópio óptico)

14- Transferir as lâminas para o PBS e contrastar com Hematoxilina de Harris normal por 3 segundos.

15- Lavar em água corrente por 10 minutos

Desidratar em álcoois (70%, 80%, 90%) – 3 min em cada

Desidratar em álcoois (Abs. I e II) – 10 minutos em cada

Diafanizar em xilol I e II – 10 min. cada.

Montar

Anexo 4



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 257/2008**, relativo ao projeto intitulado "*Estudo histológico, imunológico e parasitológico do trato gastrintestinal de cães infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi*", que tem como responsável(is) **Wagner Luiz Tafuri**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **4/ 03/2009**.

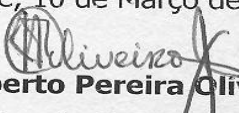
Este certificado expira-se em **4/ 03/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 257/2008**, related to the project entitled "*Histopathological, parasitological and immunohistochemical study of gastrointestinal tract of infected dogs with Leishmania (Leishmania) chagasi*", under the supervisors of **Wagner Luiz Tafuri**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 4, 2009**.

This certificate expires in **March 4, 2014**.

Belo Horizonte, 10 de Março de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 5