

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Maria Marta Figueiredo

**ESTUDO HISTOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E PARASITOLÓGICO DO TUBO  
GASTROINTESTINAL DE CÃES INFECTADOS  
COM *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***

Belo Horizonte

2013

Maria Marta Figueiredo

**ESTUDO HISTOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E PARASITOLÓGICO DO TUBO  
GASTROINTESTINAL DE CÃES INFECTADOS  
COM *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de doutor em Patologia Geral.

Orientador: Wagner Luiz Tafuri

Belo Horizonte

2013

Maria Marta Figueiredo

**ESTUDO HISTOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E PARASITOLÓGICO DO TUBO  
GASTROINTESTINAL DE CÃES INFECTADOS  
COM *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de doutor em Patologia Geral.

Orientador: Wagner Luiz Tafuri

---

Wagner Luiz Tafuri (Orientador – UFMG)

---

Cláudia Martins Carneiro - UFOP

---

Marcia Dalastra Laurenti - USP

---

Milene Alvarenga Rachid - UFMG

---

Sandra Aparecida de Lima Moura - UFOP

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2013.

Dedico essa tese ao meu marido Vítor, ao Pedro (meu filho que já chegou)  
e aos meus filhos que ainda virão.

Dedicação especial: Professor Wagner Luiz Tafuri

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A DEUS, meu PAI;

Ao Universo, que sempre conspira a meu favor;

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

À Izabela Amorim, pela gratuidade;

À toda equipe do LPL em especial Vania;

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

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

E a todos que ajudaram de alguma forma.

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

Muito obrigada!

*Um hindu tinha chegado aos arredores de certa aldeia e aí se sentou para dormir debaixo de uma árvore. Chega correndo, um habitante daquela aldeia e diz sem fôlego: “Aquela pedra! Vi que tem uma pedra. Quero aquela pedra!” O hindu mexeu na sua trouxa e tirou fora a pedra e disse: podes levá-la. O homem olhou maravilhado para a pedra. Era um diamante e talvez o maior visto no mundo!*

*Pegou, pois, o diamante e foi embora. Mas, quando veio a noite, ele virara de um lado para outro em sua cama e nada de dormir. Então, rompendo o dia foi ver de novo o hindu e o despertou dizendo: Quero que me dê essa riqueza que lhe tornou possível desfazer de um diamante tão grande assim tão facilmente.*

## RESUMO

O envolvimento do trato gastrointestinal (TGI) na leishmaniose visceral canina (LVC) se destaca fato pelo considerável número de parasitos nas porções finais: ceco e cólon, porém sem lesões acentuadas, isso é, a arquitetura intestinal não se altera. Assim, com o intuito de caracterizar a patologia intestinal na LVC foram realizados estudos morfológicos, parasitológicos e imunológicos e associação ao quadro clínico da doença. Quarenta e quatro cães positivos e seis com exames negativos para *Leishmania* foram usados nesse trabalho. O exame macroscópico do TGI revelou não haver alterações evidentes com exceção da reatividade das placas de Peyer nos animais infectados, principalmente no íleo, que se apresentava com nódulos de coloração brancacenta fazendo saliência na superfície do órgão. De modo geral, apresentaram aumento da celularidade na lâmina própria (LP) com exceção do esôfago, em comparação com animais não infectados. Havia predominância de plasmócitos, macrófagos e linfócitos, com alguns neutrófilos e eosinófilos. Não raro, os macrófagos apresentavam-se com morfologia peculiar de células epitelióides, com núcleos de aspecto vesiculoso, cromatina frouxa e citoplasma amplo. Formas amastigotas de *Leishmania* imunomarcadas por imuno-histoquímica foram observadas dentro de macrófagos na LP independente da forma clínica dos cães infectados. No intestino grosso, a maioria dos parasitos foi visualizada subjacente à muscular da mucosa, na base da LP. Ao passo que no intestino delgado as amastigotas foram encontradas, em maior proporção, próximas ao lúmen, logo abaixo do epitélio, mas de forma difusa. Os segmentos mais parasitados foram ceco e cólon. De acordo com o padrão de infecção observado ao longo do TGI, seja por nosso grupo de pesquisa ou por outros pesquisadores, investigou-se alguns marcadores leucocitários: integrinas CD11b, CD11c/CD18; receptor de monócitos circulantes e macrófagos: CD14; receptores de macrófagos e linfócitos: Toll do tipo 2 (TRL2), do tipo 9 (TLR9) e manose; antígenos linfocitários: CD4, CD8 e Foxp3. Observamos que a expressão de CD11c<sup>+</sup> e TLR2<sup>+</sup> como também CD14<sup>+</sup> e Manose<sup>+</sup> foi mais frequente no cólon em relação ao jejuno. Ao contrário, TLR9<sup>+</sup> foi mais frequente no jejuno em relação ao cólon como também observado para CD11b<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup> expressando CD14<sup>+</sup>, TLR9<sup>+</sup> e Manose<sup>+</sup>. Esses receptores se apresentaram aumentados nos animais infectados. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> apresentaram-se mais frequentes no jejuno em relação ao cólon. A frequência de CD8<sup>+</sup> não se diferenciou entre jejuno e cólon. Foi observado também que o animal infectado apresenta aumento de CD4<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> e redução de CD8<sup>+</sup>. Na LP foi feita também a avaliação da intensidade média de fluorescência (IMF) e a consequente comparação entre jejuno e cólon

dos receptores aqui avaliados. Houve diferença quanto à expressão de TLR9<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup> com IMF mais intensa no jejuno. Ao contrário, a expressão de CD14<sup>+</sup> e TLR2<sup>+</sup> foi mais intensa no cólon. O animal infectado tem IMF superior aos animais não infectados. Foram avaliadas também a frequência e a IMF das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> nos linfonodos cervicais e mesentéricos. A porcentagem de positividade desses receptores se diferenciou somente em relação aos controles, o que levou a observar que cães infectados expressam mais CD4<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> e menos CD8<sup>+</sup> que cães não infectados. Apesar da não detecção das citocinas interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no soro de todos os cães, no jejuno observou-se presença de IL-10 e TNF- $\alpha$  sendo essas mais expressadas quando comparadas ao cólon. Já a citocina IL-4 foi mais encontrada no cólon. O segmento do TGI que apresentou menor carga parasitária, apresentou simultaneamente maior frequência e expressão de receptores como CD4, Foxp3, CD11b, TLR9, além de IL-10 e TNF- $\alpha$ , ao passo que o segmento que apresentou maior carga parasitária apresentou concomitantemente maior expressão de CD14, TLR2, CD11c e IL-4. Portanto, a infecção por *Leishmania* influenciou, no jejuno, aumento da expressão de CD14, Manose, TLR9, CD11b, CD4, Foxp3 e redução da expressão de CD8; influenciou, no cólon, aumento da expressão de CD11c, CD14, Manose, TLR9, CD11b, CD4, Foxp3 e TLR2 e redução da expressão de CD8. E nos linfonodos, estimulou o aumento da expressão de CD4 e Foxp3 e redução da expressão de CD8. A mucosa intestinal do jejuno e do cólon estava intacta apesar da presença de parasitos sugerindo que esses processos constitutivos de regulação ocorrem na mucosa intestinal para controlar os danos que poderiam resultar das respostas celulares contra os patógenos. É indispensável identificar os fatores que contribuem para a ativação e/ou regulação de TLR contra o parasito em cada um dos segmentos do TGI e avaliar o quanto a ativação de TLR, em cada uma dessas células, contribui para a patologia na leishmaniose visceral.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Visceral Canina, Trato Gastrointestinal, Receptores do tipo Toll, Célula T Reguladora, *Leishmania infantum chagasi*.

## ABSTRACT

Gastrointestinal tract (GIT) disorders occur in dogs since 1980. Interestingly, we found a high parasite burden evident throughout the GIT mucosa, mainly in gross intestines in caecum and colon, but without severe lesions. It is known that in the vertebrate host GIT exerts local and systemic immunoregulatory response and it led us to consider whether *Leishmania* gains an advantage from this fact. The aim of this work was to better characterize the canine GIT pathology using histological, parasitological and immunological studies associated to the clinical status of the animals. Forty-four mongrel dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* and obtained from the Control Zoonosis Center of the Municipality of Ribeirão das Neves, Belo Horizonte Metropolitan area, Minas Gerais (MG) state, Brazil, were analyzed. Other six uninfected dogs were used as controls. After necropsy, gross analysis were done without noticing any alterations, except the Peyer's patches reactivity, localized mainly in ileum as white protuberant nodules in the wall (serosa). Under histological analysis, all infected dogs showed an increased number of cells in lamina propria (LP) except in esophagus in comparison to controls. Macrophages, plasma cells and lymphocytes were the main cells with rare presence of neutrophils and eosinophils. Many of the macrophages showed a pale and abundant cytoplasm and less dense nucleus typical of epithelioid cells. Parasite distribution in the GIT was evident in all intestinal segments and layers of the intestinal wall (mucosal, muscular and submucosal) irrespective of the clinical status of the dogs. Interestingly, parasite distribution in the small intestine was diffuse through the LP, whereas in the large intestine it was concentrated near the muscularis and distant from the intestinal lumen. However, the parasite load was statistically higher in the caecum and colon than in other segments of the GIT. Some cellular antigens were analysed from cells obtained from LP of jejunum and colon as: integrin CD11b and CD11c/CD18; the receptor of monocyte-macrophages CD14; receptors of macrophages and lymphocytes Toll type 2 (TLR2) and Type 9 (TLR9); receptors of macrophages mannose; CD4, CD8 and Foxp3 receptors of lymphocytes. In general, all studied receptors are high expressed in infected animals. We observed that expression of TLR2<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup> as well as CD14<sup>+</sup> Mannose<sup>+</sup> was more frequent in the colon compared to the jejunum. Rather, TLR9<sup>+</sup> was more frequent in the jejunum compared to the colon was also observed for CD11b<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> expressing CD14<sup>+</sup>, Mannose<sup>+</sup>, and TLR9<sup>+</sup>. T CD4<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> was more frequent in jejunum than colon. The CD8<sup>+</sup> frequency was not different between jejunum and colon, but different between jejunum/colon in controls where in controls it was higher. However, infected animals revealed

increase CD4<sup>+</sup> and Foxp3<sup>+</sup> and decrease CD8<sup>+</sup> frequencies. MFI (mean fluorescence intensity) was also carried out in cells of LP. There was difference between TLR9<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, FOXP3<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> whereas MFI was more intense in jejunum. In contrast CD14<sup>+</sup> and TLR2<sup>+</sup> expression were more intense in colon. CD11c<sup>+</sup> and Mannose<sup>+</sup> did not present any MFI difference between jejunum and colon. Frequency and IMF of T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and Foxp3<sup>+</sup> lymphocytes were analyzed in cervical and mesenteric lymph nodes. The positivity percentage of these receptors was different only related to controls. MFI was not different between lymph nodes. These results show that infected dogs have more CD4<sup>+</sup> and Foxp3<sup>+</sup>, and less CD8<sup>+</sup> antigen expression than uninfected dogs. Despite of the negative ELISA serum results for interleukin 4 (IL-4), interleukin 10 (IL-10) and tumoral necrotic factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), in jejunum we found IL-10 and TNF- $\alpha$  where they are more intense than colon. Moreover, the cytokine IL-4 were mainly found in colon. Thus, the TGI segment with lower parasite load showed high frequency and expression of receptors CD4<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, TLR9<sup>+</sup>, besides the presence of IL-10 and TNF- $\alpha$ . In contrast, the TGI segment with higher parasite load showed also concomitant high frequency of CD14, TLR2, CD11c and IL-4. We have concluded that in CVL there is a high Foxp3<sup>+</sup> in the LP of the jejunum. Probably the normal intestinal mucosa has an IL-10 dependent immunological mechanism where Foxp3<sup>+</sup> cells are able to produce this IL-10. As Foxp3<sup>+</sup> was also found in colon in normal conditions it suggests a local role of these cells in the intestinal homeostasis. Otherwise we must think that the integrity of the mucosa, both jejunum and colon was preserve despite of the presence of parasites. Thus, this may led us to consider whether *Leishmania* gains an advantage from the intestinal immunoregulatory response (immunological tolerance). Such question will require further profound research and will help to elucidate the mechanisms underlying *Leishmania* infection.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis, Gastrointestinal Tract, Toll-like Receptors, Regulatory T Cell, *Leishmania infantum chagasi*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 -** Sequência representativa da estratégia de análise de células obtidas. O gráfico A mostra a dispersão das células com seleção da região de interesse. O gráfico B mostra uma população de linfócitos (CD4+) previamente selecionada. Os gráficos C, D e E demonstra uma população de CD4+, CD8+ e FOXP3+ levando-se em consideração o ponto de corte estabelecido pelo controle de isotipo correspondente. 38
- FIGURA 2 -** Micrografia de fragmento intestinal de cães com leishmaniose visceral: (A) demarcação ( ) no íleo ilustrando a área analisada (HE, objetiva de 10); (B) lâmina própria (jejuno), onde as alterações foram observadas (HE, objetiva de 40); (C) lâmina própria (duodeno) onde foi observada distribuição do parasitismo (IHQ objetiva de 20). Obs.: as amastigotas estão coradas na cor âmbar. 40
- FIGURA 3 -** (A) imagem digitalizada de micrografia de baço com seleção das células a serem quantificadas; (B) imagem digitalizada de micrografia de baço com seleção (em verde) das células a serem contadas; (C) imagem digitalizada de micrografia de intestino com amastigotas imunomarcadas; (D) imagem binária das amastigotas referentes à imagem C; (E) imagem digitalizada da lâmina própria de intestino com demarcação em verde da área a ser analisada; (F) região da lâmina própria selecionada da figura anterior, onde somente as células da lâmina própria foram quantificadas. 42
- FIGURA 4 -** Micrografias de ceco de cão: A e B = cão não infectado; C – H = cães naturalmente infectados com *L. infantum* chagasi; (A e B) observar imagem histológica normal da mucosa (lâmina própria) muscular da mucosa e submucosa (HE, barras = 62 µm e 32 µm, respectivamente); (C e D) observar aumento da celularidade nas camadas gastrointestinais (HE, barras = 62 µm e 32 µm, respectivamente); (E) aumento do número de células de todas as camadas gastrointestinais onde o exsudato foi focal (seta branca) (HE, barra = 32µm); (F e G) imagem anterior em maior aumento: em (F), note macrófagos parasitados na lâmina própria (setas brancas), (barra = 16 µm) e em (G) observar macrófagos parasitados com *Leishmania* na muscular da mucosa (setas brancas) e submucosa (pontas de setas pretas) (barra = 16µm); (H) células gigantes multinucleadas (seta branca) e células epitelióides (seta preta) associadas ao exsudato mononuclear na lâmina própria (HE, barra = 16 µm); LP: lâmina própria, MM: muscular da mucosa; SM: submucosa; GI: Glândulas intestinais e HE: Hematoxilina-Eosina. 46
- FIGURA 5 -** Micrografias de cólon de um cão assintomático naturalmente infectado com *L. infantum*: (A) vista panorâmica da mucosa (lâmina própria), muscular da mucosa e submucosa do cólon demonstrando exsudato celular intenso e difuso (HE, barra = 32µm); (B) maior ampliação mostrando células mononucleares representadas por macrófagos parasitados com *Leishmania* (seta branca) ou não (seta preta), linfócitos e células plasmáticas (pontas de setas pretas) sem úlceras ou erosões do epitélio (HE, barra = 16µm); (C) mucosa mostrando aumento da celularidade: macrófagos com *Leishmania* podem ser observados (setas brancas) (HE, barra = 16µm); (D) micrografia mostrando carga parasitária elevada, observar macrófagos hipertróficos parasitados (seta preta), (Estreptoavidina-peroxidase, barra = 16µm). LP: lâmina própria; MM: muscular da mucosa; SM: submucosa; GI: Glândulas intestinais e HE: Hematoxilina-Eosina. 47

FIGURA 6 -	(A) fotografia da colonoscopia feita em cães previamente anestesiados; (B) biópsias de cólon para os ensaios (massa de 40 mg de tecido); (C) fragmentos sendo lavados em meio RPMI® para remover resíduos fecais e gordura; (D) células obtidas das biópsias.	50
FIGURA 7 -	Identificação das células da lâmina própria pelas suas propriedades de tamanho e granulosidade: (A) gate representativo mostrando a delimitação da subpopulação de macrófagos e linfócitos; (B) histograma representando intensidade média de fluorescência de CD4+ no cólon de cães controle e infectados e utilizando isotipo anti-IgG1, A40-12OP8, Imgenex®.	51
FIGURA 8 -	Gráficos demonstrando análise por citometria de fluxo (frequência (%)): (A) células CD4+; (B) células CD8+; (C) células CD4+FOXP3+; (D) células FOXP3+; (E) células CD11b+; (F) células CD11c+; (G) células CD14+; (H) Manose+; (I) células TLR2+; (J) células TLR9+.	52
FIGURA 9 -	Micrografias de medula óssea coradas por Giemsa, de dois cães provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) cão assintomático; (B) cão sintomático; seta apontando as amastigotas.	55
FIGURA 10 -	Micrografias apontando amastigotas (setas) em amostras de pele, marcadas por IHQ, de dois cães provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) cão assintomático; (B) cão sintomático.	56
FIGURA 11 -	Fotografia de gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da PCR convencional com os iniciadores LV1 e LV2 para o complexo <i>Leishmania donovani</i> , que amplificam um fragmento de 100pb. Canaletas 1-11: amostras de tecido da orelha dos cães diagnosticados como positivos por imuno-histoquímica, ELISA e RIFI; PM = padrão de massa molecular de 100pb; BH46 = 1ng de DNA de promastigotas de <i>L. chagasi</i> (MHOM/BR/1967?BH46); C <sup>+</sup> = amostra de cão positivo (controle positivo); C <sup>-</sup> = amostra de cão negativo (controle negativo).	56
FIGURA 12 -	Micrografias de pulmão e coração de cães controle e naturalmente infectado com <i>L. infantum chagasi</i> : (A) pulmão de cão controle (HE, objetiva de 20); (B) micrografia de pulmão de cão infectado apresentando espessamento dos septos pulmonares associado ao exsudato plasmohistiolinfocitário (HE, objetiva de 20); (C) micrografia de coração (HE, objetiva de 40).	62
FIGURA 13 -	Micrografia de rim de cão naturalmente infectado com <i>L. infantum chagasi</i> : (A) note nefrite intersticial focal crônica (seta larga) associada à atrofia glomerular e glomerulonefrite mesangioproliferativa (seta fina) (HE, objetiva de 20); (B) micrografia de rim com amastigotas imunomarcadas (seta) (Estreptoavidina-peroxidase, objetiva de 40).	63
FIGURA 14 -	Micrografia de baço de cão naturalmente infectado com <i>L. infantum chagasi</i> : (A) região de polpa branca com ausência de centro germinativo e área T dependente (HE, objetiva de 20); (B) micrografia de baço, com amastigotas imunomarcadas (seta) (Estreptoavidina-peroxidase, objetiva de 40).	64
FIGURA 15 -	Micrografia de fígado de cão naturalmente infectado com <i>L. infantum chagasi</i> . (A) fígado com inflamação perivascular (seta larga) e granuloma (seta fina) (HE, objetivo de 20); (B) micrografia de fígado,	65

com amastigotas imunomarcadas (seta) (Estreptoavidina-peroxidase, objetiva de 40).

- FIGURA 16 - Micrografia de linfonodo de cão naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*: (A) linfonodo mesentérico – note inflamação subcapsular e perda da arquitetura do órgão com áreas densamente celularizadas (HE, objetiva de 40); (B) linfonodo mesentérico com amastigotas imunomarcadas difusamente distribuídas (seta) (Estreptoavidina peroxidase, objetiva de 40); (C) micrografia do linfonodo cervical com espessamento da cápsula (seta), congestão e perda da arquitetura; (D) linfonodo cervical com amastigotas imunomarcadas (seta) (Estreptoavidina peroxidase, objetiva de 40). 66
- FIGURA 17 - Micrografia de pele de orelha de cão naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*: (A) região da derme com infiltrado inflamatório crônico, focal, densamente celularizado, composto por plasmócitos e macrófagos (HE, objetiva de 40); (B) micrografia de pele com amastigotas imunomarcadas difusamente distribuídas (seta) (Estreptoavidina peroxidase, objetiva de 40). 68
- FIGURA 18 - Micrografia de segmentos intestinais de cães controle e naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*. (A) cólon de cão controle demonstrando mucosa (lâmina própria) e muscular da mucosa (HE, objetiva de 20); (B) exsudato celular no ceco (aumento da celularidade na lâmina própria - camada mucosa) (HE, objetiva de 20); (C) predominância de células mononucleares como plasmócitos, macrófagos e linfócitos, com alguns polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos de permeio (HE, objetiva de 40); (D) macrófagos (seta) apresentavam-se com morfologia peculiar de células epitelióides com núcleos de aspecto vesiculoso, cromatina frouxa e citoplasma amplo (HE, objetiva de 40); (E e F) macrófagos epitelióides juntamente com outros macrófagos e linfócitos formavam nódulos sugerindo formação de granulomas (seta) (HE, objetiva de 40); (G e H) formas amastigotas de *Leishmania* (seta) particularmente dentro de macrófagos na lâmina própria (Estreptoavidina-peroxidase, objetiva de 40); (I) submucosa de cão controle - note a espessura da lâmina própria no controle (J) infiltrado inflamatório crônico na submucosa - note a espessura da lâmina própria no cão infectado (HE, objetiva de 20); (K) exsudato predominantemente plasmohistolinfocitário focal na submucosa e lâmina própria (HE, objetiva de 40); (L) descontinuidade da muscular da mucosa (HE, objetiva de 40); LP: lâmina própria; MM: muscular da mucosa; SB: submucosa; M: muscular. 75
- FIGURA 19 - Micrografia de segmentos intestinais de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) esôfago sem alterações (HE, objetiva de 20); (B) estômago com focos inflamatórios na base da lâmina própria e congestão vascular (HE, objetiva de 20); (C) duodeno com congestão vascular, inflamação difusa na lâmina própria e plasmocitose (seta) (HE, objetiva de 40); (D) jejuno apresentando congestão (HE, objetiva de 40); (E) íleo com inflamação focal e difusa, congestão e plasmocitose (HE, objetiva de 20); (F) ceco com inflamação difusa (HE, objetiva de 20); (G) cólon com inflamação intensa, congestão e inflamação na submucosa (seta) (HE, objetiva de 20); (H) reto com plasmocitose, congestão e inflamação difusa (HE, objetiva de 20); LP: lâmina própria; MM: muscular da mucosa; SB: submucosa. 78

Micrografias de segmentos intestinais: (A) amastigotas nos segmentos

FIGURA 20 - da lâmina própria e submucosa do cólon (objetiva de 40); (B) *Leishmanias* na lâmina própria no duodeno (objetiva de 40); (C) parasitos subjacentes à muscular da mucosa, na base da lâmina própria no ceco (objetiva de 40); (D) *Leishmanias* na lâmina própria, entre as vilosidades, logo abaixo do epitélio intestinal no duodeno (objetiva de 40) Estreptoavidina-peroxidase; LP: lâmina própria; MM: muscular da mucosa; SB: submucosa; EP: epitélio da mucosa; S: lúmen; setas apontando para as amastigotas coradas em âmbar.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Painel de anticorpos utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular.	38
TABELA 2 -	Frequência de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> no trato gastrointestinal (TGI) de cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados com <i>L. infantum chagasi</i> do Município de Ribeirão das Neves, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG).	47
TABELA 3 -	Análise morfométrica ( $\mu\text{m}^2$ ) para quantificar as formas amastigotas de <i>Leishmania</i> no trato gastrointestinal (TGI) de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com <i>L. infantum chagasi</i> do Município de Ribeirão das Neves, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG).	48
TABELA 4 -	Análise morfométrica ( $\mu\text{m}^2$ ) para quantificar as formas amastigotas de <i>Leishmania</i> no trato gastrointestinal de cães assintomáticos naturalmente infectados com <i>L. infantum chagasi</i> do Município de Ribeirão das Neves, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG).	48
TABELA 5 -	Análise morfométrica ( $\mu\text{m}^2$ ) para quantificar as formas amastigotas de <i>Leishmania</i> no trato gastrointestinal de cães sintomáticos naturalmente infectados com <i>L. infantum chagasi</i> do Município de Ribeirão das Neves, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG).	49
TABELA 6 -	Média do peso relativo (peso órgão/peso cão) dos baços, fígados e linfonodos cervicais dos cães controle e dos cães naturalmente infectados por <i>L. infantum chagasi</i> dos grupos assintomáticos, sintomáticos e controles.	60
TABELA 7 -	Avaliação macroscópica dos segmentos do trato gastrointestinal.	60
TABELA 8 -	Avaliação da carga parasitária nos órgãos de cães positivos para <i>L. infantum chagasi</i> provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG.	69
TABELA 9 -	Avaliação da carga parasitária no TGI de cães positivos para <i>L. infantum chagasi</i> provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG.	79

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	Comparação entre a frequência de receptores de células da lâmina própria no cólon de cães controle e infectados com <i>L. infantum chagasi</i> : (A) cães controle; (B) cães infectados.	54
GRÁFICO 2 -	Distribuição percentual dos resultados da recíproca da diluição reativa final dos soros de 44 cães provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG determinada pela RIFI.	57
GRÁFICO 3 -	Carga parasitária tecidual em cães positivos para leishmaniose provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) média do número de amastigotas, determinada por Giemsa, na medula óssea, em 100 células, de 44 cães com <i>L. infantum chagasi</i> ( $p = 0,0500$ ); (B) média do número de amastigotas na pele, determinada por imunohistoquímica, de 44 cães com <i>L. infantum chagasi</i> ( $p = 0,0050$ ).	58
GRÁFICO 4 -	Frequência de alterações cutâneas relacionadas à leishmaniose visceral canina em 24 animais provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG, que apresentaram sinais clínicos no exame físico.	59
GRÁFICO 5 -	Frequência de alterações relacionadas à leishmaniose visceral canina em 24 animais provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG que apresentaram sinais clínicos no exame físico.	59
GRÁFICO 6 -	Frequência da positividade tecidual, determinada por imunohistoquímica, em cães provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG.	69
GRÁFICO 7 -	Quantidade de células inflamatórias no jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum chagasi</i> .	78
GRÁFICO 8 -	Média do número de amastigotas de <i>Leishmania</i> em 20 campos, de 44 animais provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) frequência da positividade dos segmentos intestinais (B) comparação entre os segmentos intestinais: jejuno e cólon, $p = 0,0280$ ; (C) comparação entre jejuno de cães assintomáticos e sintomáticos $p = 0,6042$ ; (D) comparação entre cólon de cães assintomáticos e sintomáticos $p = 0,3280$ .	81
GRÁFICO 9 -	Correlação entre número de amastigotas de <i>Leishmania</i> e número de células inflamatórias em 44 animais provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) jejuno; (B) cólon.	81
GRÁFICO 10 -	Gráfico 10 - Porcentagem de receptores em células da lâmina própria de jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum chagasi</i> : (A) CD11c <sup>+</sup> ( $p = 0,0100$ entre jejuno e cólon) (B) CD14 <sup>+</sup> ( $p = 0,0006$ entre jejuno e cólon e $p = 0,0001$ em relação ao controle); (C) TLR2 <sup>+</sup> ( $p = 0,0001$ ) e (D) Manose <sup>+</sup> ( $p = 0,0444$ entre jejuno e cólon e $p = 0,0017$ em relação ao controle).	83
GRÁFICO 11 -	Porcentagem de receptores em células da lâmina própria de jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum chagasi</i> : (A) TLR9 <sup>+</sup> ( $p = 0,0476$ entre jejuno e cólon e $p = 0,0027$ em relação ao controle); (B) CD11b <sup>+</sup> ( $p = 0,0043$ entre jejuno e cólon e $p = 0,0001$	84

em relação ao controle); (C) CD14<sup>+</sup>/TLR9<sup>+</sup> (p = 0,0026 entre jejuno e cólon e p = 0,0002 em relação ao controle); (D) CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> (p = 0,0042 entre jejuno e cólon e p = 0,0007 em relação ao controle); (E) TLR9<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> (p = 0,0101 entre jejuno e cólon e p = 0,0126 em relação ao controle); (F) Manose<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> (p = 0,0001).

- GRÁFICO 12 - Porcentagem de receptores em linfócitos da lâmina própria de jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) CD4<sup>+</sup> (p = 0,0048 entre jejuno e cólon e p = 0,0067 em relação ao controle); (B) CD4<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> (p = 0,0003 entre jejuno e cólon e p = 0,0075 em relação ao controle); (C) CD8<sup>+</sup> (p = 0,0006 entre jejuno/cólon e controle). 85
- GRÁFICO 13 - Porcentagem de receptores em linfócitos da lâmina própria de jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) CD8<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> (p = 0,0453) entre jejuno e cólon; (B) TLR2<sup>+</sup> (p = 0,0491) entre jejuno e cólon. 86
- GRÁFICO 14 - Porcentagem de receptores em linfócitos de linfonodos cervicais e mesentéricos de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*. (A) CD4<sup>+</sup> (p = 0,0090); (B) CD4<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> (p = 0,0002); (C) CD8<sup>+</sup> (p = 0,0147). 87
- GRÁFICO 15 - Intensidade média de fluorescência de CD14 no jejuno de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* (p = 0,0247). 88
- GRÁFICO 16 - Porcentagem de macrófagos e linfócitos no jejuno, cólon e linfonodos cervicais e mesentéricos de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) frequência entre linfócitos no jejuno e cólon (p = 0,0201) e em relação aos controles (p = 0,0024); (B) frequência de macrófagos no jejuno e cólon (p = 0,0471) e em relação aos controles (p = 0,0050); (C) frequência de linfócitos entre linfonodos mesentérico e cervical (p = 0,0258) e em relação ao controle (p = 0,0001). 89
- GRÁFICO 17 - Demonstração da expressão de citocinas em amostras de jejuno e cólon de cães infectados por *Leishmania infantum chagasi*: (A) IL-10 = jejuno difere do cólon p = 0,0032; (B) IL-4 = cólon difere do jejuno p = 0,0002; (C) TNF- $\alpha$  = jejuno difere do cólon p = 0,0043. 90

## LISTA DE SIGLAS

APC - *Antigen Presenting Cells* (Célula Apresentadora de Antígenos)  
ASL - Antígeno Solúvel de *Leishmania*  
BSA - *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)  
CCZ - Centro de Controle de Zoonoses  
CD - *Cluster of Differentiation* (Grupamento de Diferenciação)  
CD4 - *Cluster of Differentiation 4*  
CD8 - *Cluster of Differentiation 8*  
CD11b - *Cluster of Differentiation 11b*  
CD11c - *Cluster of Differentiation 11c*  
CD14 - *Cluster of Differentiation 14*  
CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal  
CR3 - *Complement Receptor 3* (Receptor 3 do Complemento)  
cm – centímetros  
CY – *Cyanine* (Cianina)  
DAB - Diaminobenzidina  
DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)  
EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetraacético  
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)  
EUA – Estados Unidos da América  
FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*  
FITC - *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)  
FSC - *Foward Scatter* (Dispersão Frontal)  
Foxp3 - *Fator forkhead box P3*  
g – Gravidade  
GALT - *Gut-associated lymphoid tissue*  
GM-CSF - *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator Estimulador de Colônia de Monócitos e Granulócitos)  
Gp63 - Glicoproteína 63  
HE - Hematoxilina e Eosina  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio  
ICB – Instituto de Ciências Biológicas  
IHQ – Imuno-histoquímica  
IMF - Intensidade Média de Fluorescência  
IFN- $\gamma$  - Interferon Gama  
Ig – Imunoglobulina  
IL - Interleucina  
Kg – Quilograma  
LC – Leishmaniose cutânea  
LCD – Leishmaniose Cutânea Disseminada  
LMC – Leishmaniose muco-cutânea  
LP – Lâmina própria

LPG – Lipofosfoglicano  
LPL – Laboratório de Patologia das Leishmanioses  
LPS - Lipopolissacarídeo  
LSA - *Leishmania Soluble Antigen* (Antígeno Solúvel de *Leishmania*)  
LV - Leishmaniose Visceral  
LVC - Leishmaniose Visceral Canina  
LVH - Leishmaniose Visceral Humana  
M – Molar  
MALT – *Mucosal Associated Lymphoid Tissue* (Tecido Linfóide Associado a Mucosas)  
MG – Minas Gerais  
MHC - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Maior de Histocompatibilidade)  
mg - Miligrama  
mL – Mililitro  
mRNA – *Ribonucleic Acid Messenger* (Ácido ribonucléico mensageiro)  
ng - Nanograma  
NO - *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PAMP - *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)  
PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Solução de Fosfato Tamponada)  
PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)  
PE – *R-Phycoerythrin Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente R-Ficoeritrina)  
pH – potencial de Hidrogênio  
PRR - Padrões de Reconhecimento de Receptores  
RGB - *Red Green Blue* (Vermelho Verde Azul)  
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta  
SMM – Sistema Monocítico Mononuclear  
SSC – *Side Scatter* (Dispersão lateral)  
TGF-B - *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de Crescimento Transformante Beta)  
TGI – Trato Gastrointestinal  
Th – *T helper* (T auxiliar)  
TNF - *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)  
TLR - *Toll Like Receptor* (Receptor do Tipo Toll)  
Treg – T regulador  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
WHO - World Health Organization  
°C - Graus Celsius  
µm - Micrômetro  
% - Porcentagem

## LISTA DE ABREVIATURAS

Et al. - *et alii* (e outros)

*L.* - *Leishmania*

*Lu.* - *Lutzomyia*

p. i. - pós infecção

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	24
<b>2 REVISÃO</b>	26
<b>2.1 As leishmanioses</b>	26
<b>2.2 Ciclo biológico do parasito</b>	27
<b>2.3 Trato gastrintestinal na LV</b>	27
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	32
<b>4 OBJETIVO GERAL</b>	32
<b>4.1 Objetivos específicos</b>	32
<b>5 METODOLOGIA</b>	33
<b>5.1 Grupo Experimental</b>	33
<i>5.1.1 Cães naturalmente infectados</i>	33
<i>5.1.2 Cães não infectados – controle</i>	33
<i>5.1.3 Critério de inclusão</i>	33
<i>5.1.4 Comitê de Ética em Experimentação Animal</i>	34
<i>5.1.5 Manuseio dos animais</i>	34
<i>5.1.6 Protocolo anestésico para punção de medula e biópsias de pele para avaliação da carga parasitária</i>	34
<i>5.1.7 Eutanásia e necropsia</i>	35
<b>5.2 Técnicas empregadas nesse estudo</b>	36
<i>5.2.1 Hematoxilina-eosina</i>	36
<i>5.2.2 Imuno-histoquímica (método da Estreptoavidina-peroxidase) para detecção e avaliação da densidade parasitária tecidual em tecidos parafinados</i>	36

5.2.3 <i>Reação em cadeia da polimerase</i>	36
5.2.4 <i>Citometria de fluxo</i>	36
5.2.5 <i>ELISA e RIFI</i>	39
5.2.6 <i>Giemsa</i>	39
<b>5.3 Análises</b>	40
5.3.1 <i>Macroscopia</i>	40
5.3.2 <i>Microscopia óptica</i>	40
5.3.3 <i>Morfometria</i>	41
5.3.4 <i>Estatística</i>	42
<b>6. DESENHO EXPERIMENTAL</b>	44
<b>7. RESULTADOS</b>	45
<b>7.1 Resultados preliminares</b>	45
<b>7.2 Padronização da técnica de citometria para células de mucosa intestinal de cão</b>	49
<b>7.3 Resultados dos exames parasitológicos e sorológicos antes da necropsia</b>	54
<b>7.4 Avaliação da densidade parasitária antes da necropsia</b>	57
<b>7.5 Avaliação clínica</b>	58
<b>7.6 Macroscopia</b>	59
<b>7.7 Microscopia e parasitismo tecidual</b>	61
7.7.1 <i>Trato gastrintestinal</i>	70
<b>7.8 Avaliação quantitativa (morfométrica) das células inflamatórias</b>	78
<b>7.9 Avaliação qualitativa da carga parasitária</b>	79
<b>7.10 Avaliação quantitativa (morfométrica) da carga parasitária</b>	80
<b>7.11 Citometria</b>	82
<b>7.12 Citocinas no soro</b>	89
<b>7.13 Citocinas no intestino</b>	90

<b>8 DISCUSSÃO</b>	91
<b>9 CONCLUSÕES</b>	110
<b>REFERÊNCIAS</b>	112
<b>ANEXOS</b>	126

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma importante zoonose causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA e CHAGAS, 1937) sinonímia *L. infantum chagasi* (MAURÍCIO et al., 2000) e ocorre na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas. Na América Latina, ocorre em 12 países, dos quais 90% dos casos registram-se no Brasil, especialmente na região Nordeste (CAMARGO-NEVES et al., 2006). O ciclo do parasito causador dessa zoonose envolve cães como reservatórios da doença e, excepcionalmente, gatos (SERRANO et al., 2008; VIDES et al., 2011). Os cães albergam o parasito na forma amastigota no citoplasma de macrófagos da pele e em ampla distribuição pelo organismo com predileção pela medula óssea, baço, linfonodos e fígado, onde o protozoário multiplica-se ativamente por divisão binária (NOLI, 1999; 2005). O agente da doença é transmitido por insetos hematófagos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, sendo *Lutzomyia longipalpis* a espécie mais importante no Brasil (DIAS et al., 2003), embora outras espécies também possam transmiti-lo. No artrópode, o parasito reside na forma promastigota em seu tubo digestivo (DESJEUX, 1996). Quando no hospedeiro mamífero, o protozoário em multiplicação produz processo inflamatório, gerando nódulos na pele que, posteriormente, se convertem em lesões úlcero-crostosas (RIBEIRO, 2008). Também se multiplica em tecidos ricos em macrófagos e gera exacerbada produção de imunoglobulinas, caracterizando hiperglobulinemia típica da doença (FERRER et al., 1995). Há hipertrofia e hiperplasia de células do sistema monocítico mononuclear (SMM), gerando esplenomegalia e linfadenomegalia (KEENAN et al., 1984a). Os sinais clínicos podem iniciar em um período de 3 meses a 7 anos após a infecção. Os sinais mais comuns incluem diminuição da resistência física, perda de peso, sonolência, aumento da ingestão de água, anorexia, vômitos, diarreia e epistaxe. As lesões de pele consistem em alopecia progressiva e simétrica não pruriginosa, seborreia seca intensa que começa na cabeça e se estende para o resto do corpo (FERRER et al., 1995). É importante salientar que pode haver variações importantes na frequência de sinais clínicos e lesões, conforme a população canina avaliada, especialmente na incidência da onicogrifose, que pode chegar a surgir em 88% dos cães examinados (ALBUQUERQUE et al., 2007).

As alterações hematológicas mais observadas são hiperglobulinemia (100% dos cães), hipoalbuminemia (94%) e elevação das proteínas plasmáticas totais (91%) (SLAPPENDEL,

1988). Alterações no fígado, baço, linfonodos, medula e pele são comumente encontradas (TAFURI et al., 2001; LIMA et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010).

O envolvimento do trato gastrointestinal (TGI) na LV humana (ROSENTHAL et al., 1988; LAGUNA et al., 1994a, b e c; VILLANUEVA et al., 1994; ALONSO et al., 1997; HAMOUR et al., 1998) e LVC (ANDERSON et al., 1980; KEENAN et al., 1984a; SLAPPENDEL, 1988; GONZÁLEZ et al., 1990; FERRER et al., 1991; SILVA, et al., 2002) tem sido descrito. De acordo com alguns desses trabalhos e 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 dos parasitos do gênero *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) e Pinto et al. (2011), independente das formas clínicas dos animais, descreveram a presença das amastigotas no interior de macrófagos nas camadas histológicas desses segmentos, a saber: mucosa (lâmina própria), submucosa, muscular da mucosa e camada muscular. Todavia, apesar do parasitismo intenso nos segmentos do TGI, não há desenvolvimento de lesões acentuadas associadas. A arquitetura do intestino não se altera mesmo na presença de número acentuado de parasitos. Adicionalmente, esses autores relataram diferenças estatísticas no parasitismo nas porções finais do TGI - ceco e cólon que é mais intenso nessas regiões intestinais em comparação às demais.

Dados recentes da literatura atribuem papel imunorregulador para o TGI, não somente de forma local, mas de forma sistêmica (IZCUE e POWRIE, 2007). Assim, considerando nossos dados e os da literatura, especulamos que, a presença maciça de parasitos no TGI de cães infectados com *L. infantum chagasi*, possa ter correlação com o quadro clínico sistêmico, com parâmetros imunológicos, além de função na imunorregulação nessas condições. Esses parasitos, ao que parece, sobrevivem e se multiplicam com facilidade no microambiente da mucosa intestinal sem provocar danos ao hospedeiro. De fato, os casos de LVC descritos com o envolvimento do TGI também têm sido relatados na literatura, mas sem descrição de lesões ulcerativas ou profundas da parede intestinal. Assim, objetivamos dar continuidade a essa linha de pesquisa envolvendo o TGI na LVC, aprofundando nossos conhecimentos a respeito da regulação imunológica no microambiente intestinal, mais precisamente na mucosa de todo o TGI. Ao que sabemos os aspectos da imunorregulação mediada por células T reguladoras na mucosa do intestino ainda não foram estudados. Assim, esse estudo tem como objetivo ampliar nossa linha de pesquisa de forma mais abrangente, qualitativo e quantitativo, dos aspectos anatomopatológicos, parasitológicos e imunológicos, com ênfase na caracterização

das células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup>, nos diversos segmentos anatômicos do TGI de cães naturalmente e experimentalmente infectados por *L. infantum chagasi*.

## 2 REVISÃO

### 2.1 As leishmanioses

As leishmanioses são consideradas um conjunto de síndromes de grande complexidade que acometem seres humanos e animais. Constitui uma das seis doenças infecciosas mundiais mais importantes, sendo que algumas apresentam caráter zoonótico (DENVES, 2008). É causada por protozoários digenéticos, do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastidae (ROSS, 1903), apresentando morfologias 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 Lindemberg (1909), Escomuel (1911), Vianna (1911) e Splendore (1912) descreveram os primeiros casos e características da doença e do parasito (VERONESI e FOCACCIA, 1996). As leishmanioses manifestam-se sob quatro formas: cutânea (LC), muco-cutânea (LMC), cutâneo-disseminada (LCD) e visceral (LV) (GRIMALDI e TESH, 1993). A LV constitui a forma mais grave e fatal quando não tratada (WHO, 2008).

Os cães, *Canis familiares*, constituem o principal elo no ciclo doméstico da LV (DEANE e DEANE, 1962; KEENAN et al., 1984a e b; MARZOCHI et al., 1985) e são considerados a principal fonte de infecção para os vetores, devido à elevada carga de parasitos na pele (CHAGAS et al., 1938; DEANE, 1955). Com base na similaridade dos sinais clínicos o cão tem sido sugerido como um bom modelo para compreender a patogênese da doença humana uma vez que esses animais apresentam considerável número de sinais e características também observados na infecção humana (MORENO e ALVAR, 2002). As alterações dermatológicas nos cães são comuns e variáveis quanto à caracterização e extensão. É frequente o quadro de hiperkeratose, caracterizado pelo espessamento excessivo da epiderme com descamação, despigmentação e formação de ulcerações. A descamação pode estar presente ao redor dos olhos, nas orelhas ou difusamente pelo corpo. Os pelos podem apresentar-se opacos, frágeis e quebradiços, sendo comum o surgimento de áreas de alopecia. Alguns animais podem desenvolver dermatite seborréica como também úlceras mucocutâneas. Onicogribose e onicorrexia são comumente observados. Na fase final da infecção ocorre, em geral, paraparesia, inanição conduzindo a caquexia e óbito do animal

(GENARO, 1993; ALVAR et al., 2004). As lesões histológicas são principalmente associadas à hipertrofia e hiperplasia do infiltrado plasmioistiolinfocitário. São descritas lesões acometendo órgãos como fígado, baço, linfonodos, pulmões, medula óssea, intestinos, tegumento e vasos. Os sinais clínicos e o tempo de aparecimento dos sinais da doença são variáveis oscilando entre ausência total de sinais até síndrome clínica grave (TAFURI et al., 1996; 2001).

## **2.2 Ciclo biológico do parasito**

O protozoário do gênero *Leishmania*, descrito em 1903 por Ross, são parasitos unicelulares que infectam humanos e outros vertebrados. Esses são transferidos para hospedeiros vertebrados no momento em que fêmeas do inseto vetor infectadas, ao fazerem o repasto sanguíneo, inoculam formas promastigotas metacíclicas na pele, sendo essas rapidamente fagocitadas pelos macrófagos em um processo mediado por receptores (CUNNINGHAM, 2002). No interior dessas células hospedeiras, nos fagolisossomas, as promastigotas perdem o flagelo tornando-se arredondadas passam a se chamar amastigotas que na sequência se multiplicam por divisão binária, dando início ao sucesso da infecção. O processo ininterrupto de divisão rompe, eventualmente, o macrófago infectado liberando as amastigotas, que são capazes de infectar novas células. No trato digestório de fêmeas que ingerem macrófagos-monócitos contendo amastigotas essas se multiplicam e se diferenciam em formas flageladas denominadas promastigotas procíclicas e posteriormente, em metacíclicas, forma infectante, que expressam açúcares lipofosfoglicanos (LPG) (KEMP et al., 1997). A presença de grande quantidade de LPG e outros glicoconjugados como a metaloproteinase (gp)-63, na superfície do parasito, protege-o da ação das enzimas hidrolíticas presentes no intestino do flebotomíneo (KILLICK-KENDRICK, 1990; ALEXANDER et al., 1999). As promastigotas desligam-se do epitélio intestinal e migram para a probóscide, de onde são transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado, fechando, dessa maneira, o ciclo. Um flebotomíneo infectado é capaz de inocular de uma a 1000 formas promastigotas metacíclicas em cada repasto (ADLER e THEODOR, 1931; WARBURG et al., 1986).

## **2.3 Trato gastrointestinal na LV**

O comprometimento do TGI na LVH já foi descrito (ROSENTHAL et al., 1988; LAGUNA et al., 1994a; LAGUNA et al., 1994b; VILLANUEVA et al., 1994; ALONSO et al., 1997; HAMOUR et al., 1998). Muigai e colaboradores em 1983, estudando a função do intestino delgado em pacientes humanos com LV notaram redução da absorção de vitamina A e açúcar d-xilose. Na microscopia observaram parasitismo na mucosa jejunal e infiltrado moderado de células inflamatórias, composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Em 1995, Freitas et al. verificaram em crianças portadoras de LV o comprometimento da mucosa intestinal além de evidenciarem amastigotas de *Leishmania*. Esses autores ainda observaram correlação entre o parasitismo e alterações patológicas, ou seja, quanto maior o grau de parasitismo maior a intensidade das alterações patológicas observadas.

Anderson e colaboradores em 1980 relataram macrófagos parasitados com amastigotas de *Leishmania* na lâmina própria e submucosa de estômago, duodeno, jejuno, íleo e 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 ocorrência de colite ulcerativa em cães experimentalmente infectados com *L. infantum*, caracterizada pela presença de amastigotas na mucosa e submucosa do cólon, associada 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 plasmócitos, linfócitos, alguns neutrófilos e macrófagos parasitados ou não por amastigotas.

Hervás e colaboradores em 1996 relataram alterações no TGI em um chacal (*Canis aureus*) com LV. Nesse animal foi observada hemorragia gástrica associada a macrófagos parasitados com *Leishmania* na lâmina própria do estômago. Os autores também observaram infiltração inflamatória difusa na mucosa e submucosa dos intestinos delgado e grosso composta predominantemente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos parasitados.

De acordo com resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa (SILVA et al., 2002; PINTO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2011), formas amastigotas de *Leishmania* são facilmente observadas ao longo de algumas porções do TGI (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon). De fato, Silva et al. (2002) descreveram presença de amastigotas no interior de macrófagos de todas as camadas histológicas desses segmentos. Todavia, apesar do parasitismo intenso, não se observou lesões. A partir das revisões percebe-se variações nos

achados clínicos associados aos anatomopatológicos, sendo os achados de cada trabalho importantes, porém pouco abrangentes na avaliação sistemática de todo o sistema gastrointestinal.

Dados da literatura atribuem papel imunorregulador para o TGI de forma tanto local, quanto sistêmica (IZCUE et al., 2009). A *Leishmania*, ao que parece, sobrevive e se multiplica com facilidade no microambiente da mucosa intestinal sem provocar danos ao hospedeiro seguramente devido à notável regulação imunológica no microambiente intestinal.

A detecção específica de microrganismos por células imunes inatas é mediada pelos padrões de reconhecimento de receptores (PRRs). Esses receptores regulam a resposta imune inata de mamíferos identificando os ligantes chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs = *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) como os glicolipídeos, peptídeoglicanos e lipopeptídeos, compartilhados por um extenso número de microrganismos. Esses receptores têm sido descritos em vários tipos de células incluindo leucócitos, onde o reconhecimento dos PAMPs leva a produção de citocinas pró-inflamatórias (BECKER et al., 2003). Receptores do tipo Toll (TLR - *Toll-like Receptors*) são PRRs e sua contribuição contra infecções parasitárias ganhou a atenção na última década. TLRs são receptores essenciais que medeiam o reconhecimento das estruturas microbianas e induzem respostas inflamatórias e adaptativas. Vários estudos têm mostrado o reconhecimento de moléculas derivadas de *Leishmania* por diferentes receptores Toll (de VEER et al., 2003; TUON et al., 2008). Treze TLRs de mamíferos já foram descritos, sendo dez deles expressados em seres humanos, cada um responsável por reconhecimento de estruturas microbianas distintas (TUON et al., 2008; FARIA et al., 2012).

A mucosa é o sítio efetor do intestino. A homeostase intestinal parece ser resultado de interação perfeita entre as células T ativadas, plasmócitos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos, que caracterizam um estado de inflamação fisiológica. No entanto, os antígenos da microbiota e da dieta são constantemente absorvidos e atingem a lâmina própria (LP), placas de Peyer, folículos linfóides isolados localizados na camada mucosa, bem como os nódulos linfáticos mesentéricos. Esse tecido linfóide associado ao intestino (*GALT-Gut-associated lymphoid tissue*) constitui a maior e mais complexa estrutura imunológica do corpo sendo capaz de montar respostas imunitárias protetoras contra patógenos, mantendo a tolerância a antígenos ambientais inofensivos, tais como alimentos e patógenos comensais (IWASAKI e MEDZHITOV, 2004; MACPHERSON e HARRIS, 2004; KELLY et al., 2005). Tal como acontece com outras células do corpo dos vertebrados, as células intestinais podem expressar todos os tipos de TLR. No entanto, o epitélio intestinal normal não é inflamado

apesar do estreito contato com elevada densidade de organismos comensais que podem suscitar inflamação (MACPHERSON e HARRIS, 2004; KELLY et al., 2005; PLATT e MOWAT, 2008). A expressão de diferentes TLRs em compartimentos anatômicos distintos no epitélio intestinal é capaz de evitar a super estimulação da resposta inflamatória (TESTRO e VISVANATHAN, 2009; ORTEGA-CAVA et al., 2003; IWASAKI e MEDZHITOV, 2004). mRNA de TLR2 canino já foi sequenciado com expressão moderada nos intestinos delgado e grosso (ISHII et al., 2006). Burgener e colaboradores (2008), utilizando RT-PCR, detectou mRNA que codifica para TLR2 e TLR9 no duodeno e cólon de cães com desordens crônicas intestinais. Eles também descreveram expressão de TLR9 em todos os outros segmentos do TGI.

Vários receptores cooperam com TLRs no reconhecimento de moléculas de patógenos. CD14 e a integrina CD11b/CD18 (CR3 - receptor de complemento do tipo 3 ou Mac-1), são exemplos de tais receptores (TRIANTAFILOU e TRIANTAFILOU, 2002). Em um dos estudos realizados por nosso grupo, as células mononucleares do sangue periférico de cães infectados foram avaliadas utilizando receptores de superfície incluindo CD14, CD11b, TLR2 e MHCII. Cães positivos para *Leishmania*, tendo monócitos CD14<sup>+</sup> com maior expressão de CD11b<sup>+</sup>, tiveram menor carga parasitária no tecido da orelha. Além disso, esses parasitos não foram capazes de infectar flebotomíneos. Por outro lado, cães com menor expressão de CD11b<sup>+</sup> em monócitos CD14<sup>+</sup> tiveram maior carga parasitária no tecido da orelha e parasitos foram capazes de infectar flebotomíneos (AMORIM et al., 2011). Esse resultado nos levou à conclusão de que cães com monócitos CD14<sup>+</sup> com maior expressão de CD11b<sup>+</sup> são mais resistentes ou poderia modular a resposta imune celular essencial para eliminar a *Leishmania* do tecido. Nos tecidos, os macrófagos apresentam em sua superfície, um complexo arranjo de receptores capazes de mediar a ligação de ampla diversidade de ligantes. Os receptores pertencentes à família das integrinas apresentam fundamental importância na interação *Leishmania*-macrófago (MOSSER e ROSENTHAL, 1993; CUNNINGHAM, 2002).

Dados recentes demonstraram também que TLR9 tem função no reconhecimento de *Leishmania* (TUON et al., 2008), embora várias questões relacionadas ao papel de TLR2 e TLR9, durante a infecção causada por *L. infantum* no TGI canino, permanecem por ser elucidados. Pelo fato do reconhecimento do protozoário por TLR ser frequentemente associado à produção de citocinas pró-inflamatórias, com produção de moléculas efetoras adicionais, é sem dúvida importante determinar as consequências da ativação do TLR durante a infecção por *Leishmania*.

O tecido linfóide gastrointestinal contém aproximadamente 50% de todos os linfócitos no corpo e acredita-se ser essencial na imunidade tanto local quanto sistêmica,

incluindo a modulação da resposta imune. Assim, as células T podem ser de particular importância para a regulação imune local (MAKITA et al., 2004). O TGI representa a superfície principal onde o organismo encontra antígenos exógenos. Assim, a resposta imunitária no intestino tem de ser finamente ajustada para evitar infecção, mantendo tolerante aos antígenos alimentares e bactérias residentes (GAMBINERI et al., 2003). A capacidade das células TCD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (*Factor forkhead box P3*) que tem função reguladora, de resolver uma reação inflamatória estabelecida, levanta a possibilidade de que essas células possam ser úteis como agentes terapêuticos para doenças inflamatórias crônicas em humanos (UHLIG et al., 2006). Já foi relatado que durante a cura de colite experimental, células Treg proliferam e se acumulam nos linfonodos mesentéricos e também na LP do cólon. O marcador de células Treg mais específico conhecido atualmente é o fator de transcrição Foxp3 e atua como componente chave na regulação do seu desenvolvimento e função (FONTENOT e RUDENSKY, 2005). Treg é conhecida pela sua importância na homeostase intestinal (MACPHERSON e HARRIS, 2004; FANTRY, 2002) e já foi relatada sua capacidade de curar colite estabelecida, o que está associado à sua proliferação no intestino. Embora a maioria dos estudos sobre homeostase intestinal enfoca em Treg natural do timo, também há evidências de que o intestino, com o seu tecido linfóide associado, é um local para a indução de Treg a partir de precursores *naive* (UHLIG et al., 2006). Célula dendrítica intestinal especializada, que expressa a integrina CD103, está envolvida no desenvolvimento de Treg, facilmente identificada no cólon e nódulos linfáticos mesentéricos (ANNACKER et al., 2005; JOHANSSON-LINDBOM et al., 2005). Em ambos os locais, a progênie das células Treg se deve ao contato direto com as células dendríticas. A célula dendrítica intestinal é especializada em induzir resposta altamente tolerangênica de células B e T através da indução de células T e secreção de IgA (KRETSCHMER et al., 2005). Contudo, não significa necessariamente que apenas as células Foxp3 periféricamente induzidas podem controlar a inflamação intestinal (SINGH et al., 2001). Ainda há muito a ser aprendido sobre o papel de Tregs originadas no timo e intestinos na tolerância para com os antígenos estranhos, como protozoários *Leishmania*.

Assim, com o intuito de dar continuidade a essa linha de pesquisa envolvendo o TGI na LVC, realizamos estudos morfológicos e parasitológicos com suas associações ao quadro clínico dos cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Estudos sistemáticos avaliando alterações anatomopatológicas, parasitológicas e imunológicas do TGI associados ou não ao quadro clínico de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* não foram realizados. Alterações histológicas, parasitológicas e alguns aspectos imunológicos parecem estar envolvidos com a tolerância do parasito na mucosa dos segmentos do TGI. Isso porque frequentemente observamos presença de parasitos em todo o TGI sempre relacionado a uma arquitetura intestinal íntegra dos cães infectados independente das diferentes formas clínicas.

### **4 OBJETIVO GERAL**

Correlacionar dados clínicos com os achados anatomopatológicos, imunológicos e parasitológicos, no trato gastrointestinal de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*.

#### **4.1 Objetivos específicos**

1. Realizar estudo anatomopatológico (macro e microscopia) e morfométrico das lesões, das células inflamatórias e do parasitismo de todos os segmentos do TGI dos animais, por Hematoxilina e Eosina (HE) e imuno-histoquímica (IHQ);
2. Realizar análise fenotípica de células mononucleares macrófagos e linfócitos obtidos da lâmina própria dos segmentos do TGI, jejuno e cólon, e dos linfonodos cervical e mesentérico pela técnica de Citometria de fluxo;
3. Analisar a expressão das citocinas pela técnica de ELISA, como: interleucina 10 (IL-10), interleucina 4 (IL-4) e *tumoral necrosis factor-alfa* (TNF- $\alpha$ ).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1. Grupo experimental

Os cães utilizados nesse trabalho foram cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de Ribeirão das Neves, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, considerada área endêmica. Como medida de vigilância sanitária, essas prefeituras, após levantamento sorológico, realizam captura e eutanásia dos animais soro-positivos.

#### 5.1.1 Cães naturalmente infectados

Quarenta e quatro cães, machos (24) e fêmeas (20), sem raça e idade definidas, com exames sorológicos - reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) positivos para leishmaniose, foram selecionados para esse trabalho.

#### 5.1.2 Cães não infectados - controle

Seis cães machos (4) e fêmeas (2), sem idade definida e sabidamente negativos para leishmaniose por RIFI e ELISA foram usados como cães controle. Esses foram provenientes de Barbacena-MG (área não endêmica) adquiridos pelo laboratório de patologia das leishmanioses (LPL).

#### 5.1.3 Critério de inclusão

Os cães recebidos do CCZ, com testes sorológicos positivos, passaram por período de quarentena no canil do Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Os testes sorológicos foram feitos novamente, somado ao parasitológico da medula (esfregaço), pela coloração de Giemsa, à reação de imuno-histoquímica (IHQ) e reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) da pele de orelha, sendo todos empregados para confirmação da infecção. Apenas os positivos para todos os testes foram incluídos no grupo de cães positivos e aqueles que foram negativos para os testes, compuseram o grupo controle. Em todos os testes, os resultados foram expressados de forma qualitativa (positivo ou negativo).

#### *5.1.4 Comitê de Ética em Experimentação Animal*

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA-UFMG) sob o protocolo de número 257/2009 (ANEXO 1).

#### *5.1.5 Manuseio dos animais*

Os animais infectados receberam uma dose de vacina sêxtupla Vanguard<sup>®</sup> e uma dose de vacina anti-rábica Defensor<sup>®</sup> (Pfizer<sup>®</sup>, 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<sup>®</sup>, Agener União, Brasil) em dose única. Foram empregados produtos tópicos de efeito anti-ectoparasitário prolongado (Top Line<sup>®</sup>, Merial Saúde Animal) e repelentes contra flebotômíneos (Scalibor<sup>®</sup>, Intervet, Holanda).

Os cães foram mantidos no canil do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, onde receberam água e alimentação industrializada à vontade. Foram distribuídos em baias coletivas, que são teladas e ventiladas, respeitando a lotação de cinco animais/baia. Essas foram higienizadas diariamente com hipoclorito de sódio a 1% e borrifadas trimestralmente.

Após avaliação clínica e confirmação da infecção em material obtido de biópsias (sangue, medula e pele) os cães foram classificados em assintomáticos (n = 20), quando nenhum sinal clínico sugestivo da infecção foi observado, lembrando que é comum a forma assintomática da doença, e, em sintomáticos (n = 24), quando pelo menos um sinal sugestivo da doença for evidenciado, como lesões de pele (alopecia, seborreia, ulcerações e onicogribose), linfadenopatia e emagrecimento.

#### *5.1.6 Protocolo anestésico para punção de medula e biópsias de pele para avaliação da carga parasitária*

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

A medula óssea foi obtida através de punção do aspirado medular, na extremidade anterior do esterno. Depois de administrado e atingido o plano anestésico, foram realizadas tricotomia e anti-sepsia (Polivinil Pirrolidona Iodo 10%) da região alvo. O conteúdo medular

foi aspirado com agulha 18G acoplada a uma seringa de 10mL. De cada animal foi aspirada uma amostra de aproximadamente 1,5mL de conteúdo dos quais cerca de 1mL foi imediatamente transferido para tubo de microcentrífuga e congelado a -80°C para posterior análise. Do restante foram feitos dois esfregaços por extensão em uma lâmina de vidro (Invicta<sup>®</sup>, Brasil), previamente limpa e desengordurada, sendo posteriormente corada pela técnica de Giemsa.

A avaliação do parasitismo em fragmentos de pele foi realizada a partir de biópsia da face interna da orelha direita, com a retirada de um fragmento, com o auxílio de um *punch* de cinco milímetros de diâmetro (Punch para Biópsia<sup>®</sup>, Kolplast, Brasil). Essa biópsia foi mantida em formol tamponado, emblocada em parafina e destinada à reação tanto de IHQ quanto de PCR.

#### 5.1.7 Eutanásia e necropsia

Após confirmação da positividade dos cães, a eutanásia foi realizada cumprindo Resolução n.º 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. Todos os animais foram anestesiados com associação de 2,0mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (2%) (Anesedan<sup>®</sup>, Vetbrands, Brasil) e 22mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (10%) (Ketamina Agener<sup>®</sup>, Agener União, Brasil) via intramuscular. Dez minutos após a indução anestésica foi administrado via endovenosa lenta, 20mg/Kg de tiopental sódico (Thiopentax<sup>®</sup> 1g, Cristália, Brasil) até obtenção do estado de anestesia geral. Imediatamente foi aplicado, via endovenosa, uma associação de embutamina, mebenzônio e tetraciclina (T61<sup>®</sup>, Invert Schering-Plough Animal Health, EUA) na dose letal de 0,33mL/Kg de p.v., para obtenção de parada cardiorrespiratória. Iniciada a necropsia, órgãos como fígado, baço, linfonodos cervical e mesentérico, segmentos do TGI (esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto), coração, pulmão, rins e pele foram analisados macroscopicamente levando-se em consideração a presença de lesões. Baço, fígado e linfonodos foram avaliados quanto ao tamanho, peso e lesões. Os segmentos intestinais foram coletados em cortes transversais de 1cm de espessura, exceto o estômago que foi biopsiado com corte sagital na porção do corpo. O esôfago foi coletado na porção torácica; o duodeno a 10cm do estômago; o íleo 20cm anterior à válvula ileocecólica; o ceco a 3cm do apêndice, o cólon foi na porção transversal e o reto 5cm anterior à porção anal. Os fragmentos de todos os órgãos citados anteriormente, imediatamente após a coleta, foram fixados em solução de formalina

tamponada a 10% (pH 7,2) e posteriormente, incluídos em parafina, cortados e corados por HE e HIQ. Parte desses tecidos foi mantida em freezer a -20°C com gelatina crioprotetora (Tissue-Tek) e outra parte em freezer -80°C com *RNAlater*, conforme necessidade para o estudo imuno-histoquímico e molecular.

## **5.2 Técnicas empregadas nesse estudo**

### *5.2.1 Hematoxilina-eosina*

As lâminas, contendo cortes parafinados de tecido, foram inicialmente desparafinadas em xilol, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes e lavadas com água corrente. Logo após, coradas em hematoxilina e, após nova lavagem, coradas em eosina. As lâminas foram banhadas em água corrente, desidratadas em soluções de álcool crescentes e diafanizadas em xilol e montadas com Entelam™ (ANEXO 2A).

### *5.2.2 Imuno-histoquímica (método da Estreptoavidina-peroxidase) para detecção e avaliação da densidade parasitária tecidual em tecidos parafinados*

Nos fragmentos parafinados obtidos das biópsias, foi realizada a técnica de IHQ descrita por Tafuri et al. (2004) (ANEXO 2B).

### *5.2.3 Reação em cadeia da polimerase*

A extração do DNA das amostras dos fragmentos de pele incluídos em parafina foi realizada utilizando o “DNA ISOLATION KIT®” (Gentra, EUA) seguindo instruções do fabricante (ANEXO 2C).

### *5.2.4 Citometria de fluxo*

Durante a eutanásia, fragmentos de 1cm de jejuno e cólon, um linfonodo cervical e um mesentérico foram coletados e preparados para obtenção das células. O protocolo dessa obtenção foi publicado na Nature Protocols Exchange (Figueiredo et al., 2011) em anexo. As células marcadas com anticorpos de superfície e intracitoplasmáticos apontados na Tabela 1

foram analisadas em citômetro de fluxo equipado com laser emitido a 488nm (FACSVantage<sup>®</sup>, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA).

A sequência da estratégia de análise de células obtidas da lâmina própria foi feita baseado na aquisição de células sem marcação, de células marcadas com controle de isotipo correspondente e de células marcadas com anticorpos. Cada aquisição de amostras no citômetro, foi realizada compensação com células não marcadas e células marcadas com os fluorocromos utilizados. As células foram adquiridas e visualizadas num gráfico de dispersão lateral (*Side Scatter* - SSC) *versus* dispersão frontal (*Forward Scatter* - FSC) de luz para identificação das populações de células intestinais. A partir de então, foi feito o estabelecimento da população em R1 de mononucleares caracterizados por tamanho intermediário e baixa granulosidade para os macrófagos e outros mononucleares e dimensão reduzida com ausência de granulosidade para os linfócitos. A partir dessa região (R1), foram criados três outros gráficos de pontos utilizando a combinação simples dos três fluorocromos utilizados no experimento (FITC, PE e Cy), em FL1 x FL2 x FL3, permitindo a identificação de células expressando os receptores estudados, sem usar os receptores demonstrados na Tabela 1 como marcadores celulares. O interesse nessa análise foi, tão somente, quantificar a frequência e a expressão dos receptores das células, quaisquer fossem elas, da lâmina própria e de linfonodos.

Para avaliar a população de linfócitos, tal população foi selecionada através da seleção da região R1 (linfócitos) em gráficos de distribuição pontual de tamanho *versus* granulosidade, o que possibilitou a seleção da população celular de interesse. Foram construídos gráficos de pontos FL1 x FL2 x FL3 permitindo a identificação de subpopulações desejadas: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Na FIG. 1 observamos um exemplo dessa construção.

O perfil fornecido pela emissão das fluorescências nas células marcadas foi delimitado em quadrantes. A partir da expressão dos receptores acima citados, em células da lâmina própria e linfonodos, obtiveram-se quatro divisões acompanhadas de uma análise quantitativa dos dados. Essa análise é fundamentada na porcentagem de células marcadas com cada tipo de fluorocromo, sendo que o ponto de corte para avaliação dessa expressão foi feito a partir do isotipo. Para todos os receptores, foram determinadas a frequência e a intensidade média de fluorescência (IMF).

A aquisição foi de 40.000 eventos e os resultados numéricos foram analisados e processados utilizando-se FlowJo 7.2<sup>®</sup> (Three Star. Inc., Ashland, OR, EUA).

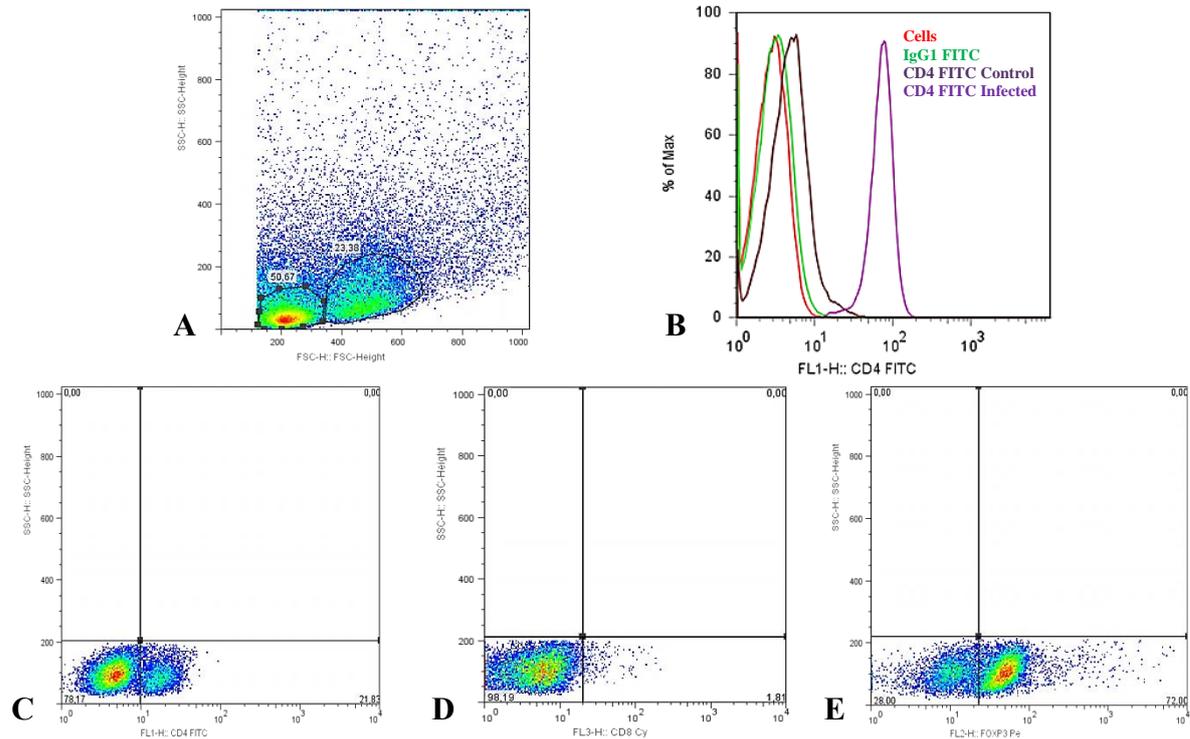


Figura 1 - Sequência representativa da estratégia de análise de células obtidas. O gráfico A mostra a dispersão das células com seleção da região de interesse. O gráfico B mostra uma população de linfócitos ( $CD4^+$ ) previamente selecionada. Os gráficos C, D e E demonstra uma população de  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  e  $FOXP3^+$  levando-se em consideração o ponto de corte estabelecido pelo controle de isotipo correspondente.

**TABELA 1 - Painel de anticorpos utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular.**

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Fabricante	Diluição
RAT anti-canine CD4	MCA1038	FITC	Serotec	1/40
Mouse anti-canine CD8	MCA1039F	CY	Serotec	1/40
Anti-mouse/rat FOXP3	FJK-16s	PE	eBiosciense	1/20
Mouse anti-humanTLR-9	IMG-305A	PE	Imgenex	1/30
Mouse anti human-TLR-2	2B4A1	PE	SouthernBiotech	1/20
Mouse anti-human Manose	Ab8918	FITC	abcam	1/20
Mouse anti-canine CD11b	MCA 1777S	FITC	Serotec	1/20
Anti-canine CD11c		FITC	Serotec	1/20
Mouse anti-human CD14	MCA1568C	CY	Serotec	1/20
Goat anti-dog IgG1	A40-12OP8	FITC	Imgenex	1/20
Sheep anti-dog IgG2a	HOPC-1	PE	SourthenBiotech	1/20

### 5.2.5 ELISA e RIFI

Após coagulação à temperatura ambiente, o sangue coletado foi submetido à centrifugação a 1500g durante 40min. O soro obtido foi transferido para tubo de microcentrífuga de 1,5mL e congelado a -20°C até seu uso.

A detecção de anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania*, nos soros obtidos, foram realizados pelo método de ELISA de acordo com a técnica descrita por VOLLER et al. (1979). Os antígenos utilizados foram produzidos a partir de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* cepa MHOM/BR/1967/BH46, já rotineiramente utilizados no Laboratório de Sorologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG. (ANEXO 2D).

A concentração das citocinas IL-4 (ANEXO 2E) e IL-10 (ANEXO 2F), TNF- $\alpha$  (ANEXO 2G), TGF- $\beta$  (ANEXO 2H) e IFN- $\gamma$  (ANEXO 2I) foi mensurada por meio de ELISA no soro e sobrenadante de macerado de jejuno e cólon. Os ensaios foram realizados utilizando kits de R & D Systems (DuoSet kits) de acordo com as instruções do fabricante. Cem miligramas do tecido do jejuno e do cólon dos animais infectados e controles foram utilizados para esse ensaio.

A RIFI foi utilizada para detectar anticorpos anti-*Leishmania*. Os controles positivos consistiram de soro obtido a partir de cães infectados, ao passo que o soro de animais não infectados foi utilizado como controle negativo (ANEXO 2J).

### 5.2.6 Giemsa

Pequenas amostras de medula óssea (equivalente a 30 $\mu$ L) foram usadas para fazer os esfregaços por extensão em lâminas previamente desengorduradas. Essas foram secas à temperatura ambiente e fixadas com álcool metílico (Álcool Metílico PA, LabSynth Produtos para Laboratório, Brasil) por 5min e coradas com Giemsa. As formas amastigotas de *Leishmania* foram detectadas por meio de microscopia de luz, utilizando óleo de imersão (objetiva de 100) (ANEXO 2L).

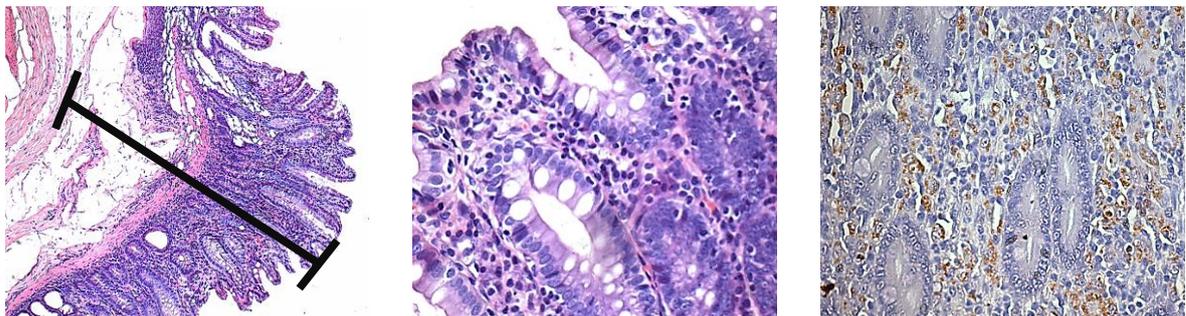
## 5.3 Análises

### 5.3.1 Macroscopia

Avaliação macroscópica objetivou detectar parasitos, lesões segmentares, úlceras, atrofia ou espessura aumentada da parede intestinal, hemorragia, enterite regional, nódulos e hiperemia em todos os segmentos do TGI. Também foi feita avaliação da aparência, peso e aspectos físicos dos outros órgãos (item 5.1.7) durante a necropsia.

### 5.3.2 Microscopia óptica

Na avaliação microscópica (FIG. 2) foram observadas reação inflamatória e distribuição do parasitismo tecidual sendo considerados sob o aspecto qualitativo. Nos segmentos do TGI considerou-se a presença de inflamação difusa; degeneração; abscessos de criptas; distorção de criptas; atrofia de mucosa; depleção de células caliciformes; células gigantes de Langhans; granulomas epitelióides; plasmocitose; hemorragia; metaplasia; retocolite ulcerativa; pancolite; atrofia total vilositária; atrofia parcial de vilosidade; edema; espessamento da parede intestinal; inflamação aguda associada; microabscesso críptico; redução de células caliciformes; congestão vascular; criptas irregulares; pólipos inflamatórios; arterite; espessamento da mucosa; deposição de hemossiderina topografia da carga parasitária. Essas alterações são comuns em doenças inflamatórias do intestino.



**Figura 2 - Micrografia de fragmento intestinal de cães com leishmaniose visceral: (A) demarcação (—) no íleo ilustrando a área analisada (HE, objetiva de 10); (B) lâmina própria (jejuno), onde as alterações foram observadas (HE, objetiva de 40); (C) lâmina própria (duodeno) onde foi observada distribuição do parasitismo (IHQ objetiva de 20). Obs.: as amastigotas estão coradas na cor âmbar.**

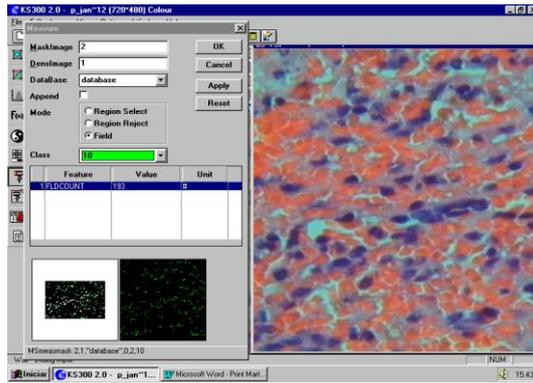
Além dos oito segmentos do trato gastrointestinal avaliados (esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto) foi feito, objetivando avaliação mais completa do animal doente, análise de outros órgãos tais como pele de orelha, linfonodos cervical e

mesentérico, baço, fígado, medula, coração, pulmão e rins, caracterizando por frequência, as alterações histopatológicas comuns em cães com LV como descrito por Tafuri et al. (2001), além da avaliação qualitativa da carga parasitária.

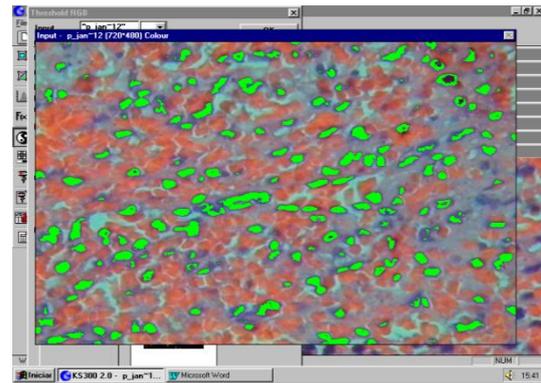
Essas alterações foram classificadas de forma semi-quantitativa, levando em consideração a intensidade de acometimento: discreta = quando menos de 25% do fragmento se apresentava acometido; moderada = quando de 25 a 50% do fragmento apresentava acometido e acentuada = quando mais de 51% do tecido apresentava-se acometido. Para maximizar os resultados, todos os campos do corte foram examinados com objetiva de 40.

### 5.3.3 Morfometria

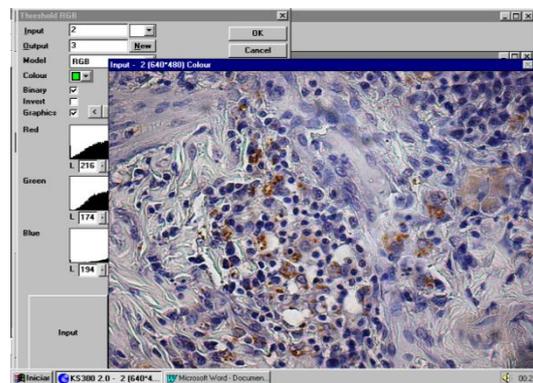
Na avaliação morfométrica levou-se em consideração celularidade e a carga parasitária tecidual. Para essa avaliação foram escolhidos aleatoriamente e fotografados 20 campos de cada tecido, no microscópio óptico ZEISS, com microcâmera JVC-TK1270 acoplada e com função *Red Green Blue* (RGB) ativada em objetiva de 40x, como descrito por Caliari (1997) e Pinto et al. (2011). Para as comparações entre os fragmentos e entre os grupos levou-se em consideração a área ( $\mu\text{m}^2$ ) ocupada pelas formas amastigotas e o número de células identificadas em 20 campos de cada tecido, nas lâminas marcadas pela IHQ e HE, respectivamente. A quantificação foi realizada no programa KS300 pertencente ao Laboratório de Processamento de Imagens, no Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG. Para quantificar as células inflamatórias foi usado o método de análise interativa (FIG. 3 A e B) e para as amastigotas foi usado o método de imagem binária (FIG. 3 C e D). Pelo fato do intestino ter topografia heterogênea não permitindo que 100% das imagens contenha apenas lâmina própria no método de varredura e captura aleatória, foi adotado o imageamento com interrupções, para que todas as imagens digitalizadas tivessem a mesma área do tecido de interesse. Nas áreas nas quais a placa de Peyer invadia a lâmina própria, o que foi encontrado com frequência nesse trabalho, foi adotado o imageamento tipo varredura linear pontual, assim a área de intensa população linfocitária era excluída da contagem (FIG. 3 E e F).



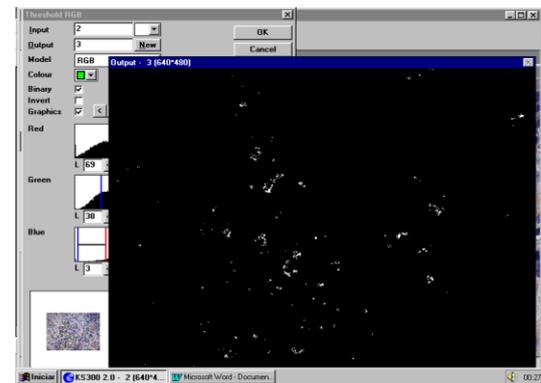
A



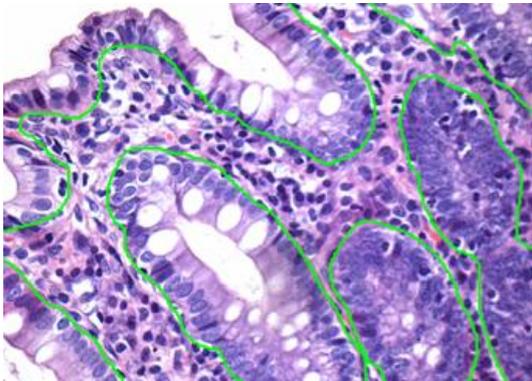
B



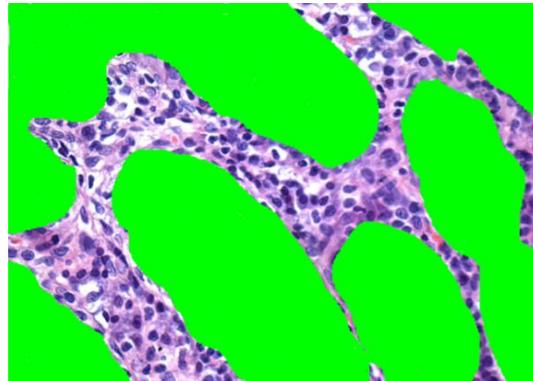
C



D



E



F

**Figura 3 - (A) imagem digitalizada de micrografia de baço com seleção das células a serem quantificadas; (B) imagem digitalizada de micrografia de baço com seleção (em verde) das células a serem contadas; (C) imagem digitalizada de micrografia de intestino com amastigotas imunomarcadas; (D) imagem binária das amastigotas referentes à imagem C; (E) imagem digitalizada da lâmina própria de intestino com demarcação em verde da área a ser analisada; (F) região da lâmina própria selecionada da figura anterior, onde somente as células da lâmina própria foram quantificadas.**

### 5.3.4 Estatística

Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico computacional Prism 5.0, adotando um nível de significância de  $p < 0,05$ . Foram feitos testes para identificar

se a natureza da distribuição dos dados seguia distribuição normal para assim definir se a análise seria paramétrica ou não paramétrica com propósito de se definir o teste a ser empregado em cada caso.

Teste ANOVA foi empregado para comparar um mesmo evento entre vários grupos, por exemplo: comparação da expressão de um determinado receptor em linfócitos entre cães assintomáticos, sintomáticos e controle negativo. Algumas variáveis avaliadas nesse estudo não apresentaram distribuição amostral do tipo normal, verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e, portanto, foram aplicados os testes não paramétricos para identificar diferenças estatísticas entre elas. O teste Kruskal Wallis foi empregado para variáveis independentes com o pós-teste *Dunn's Multiple Comparison*.

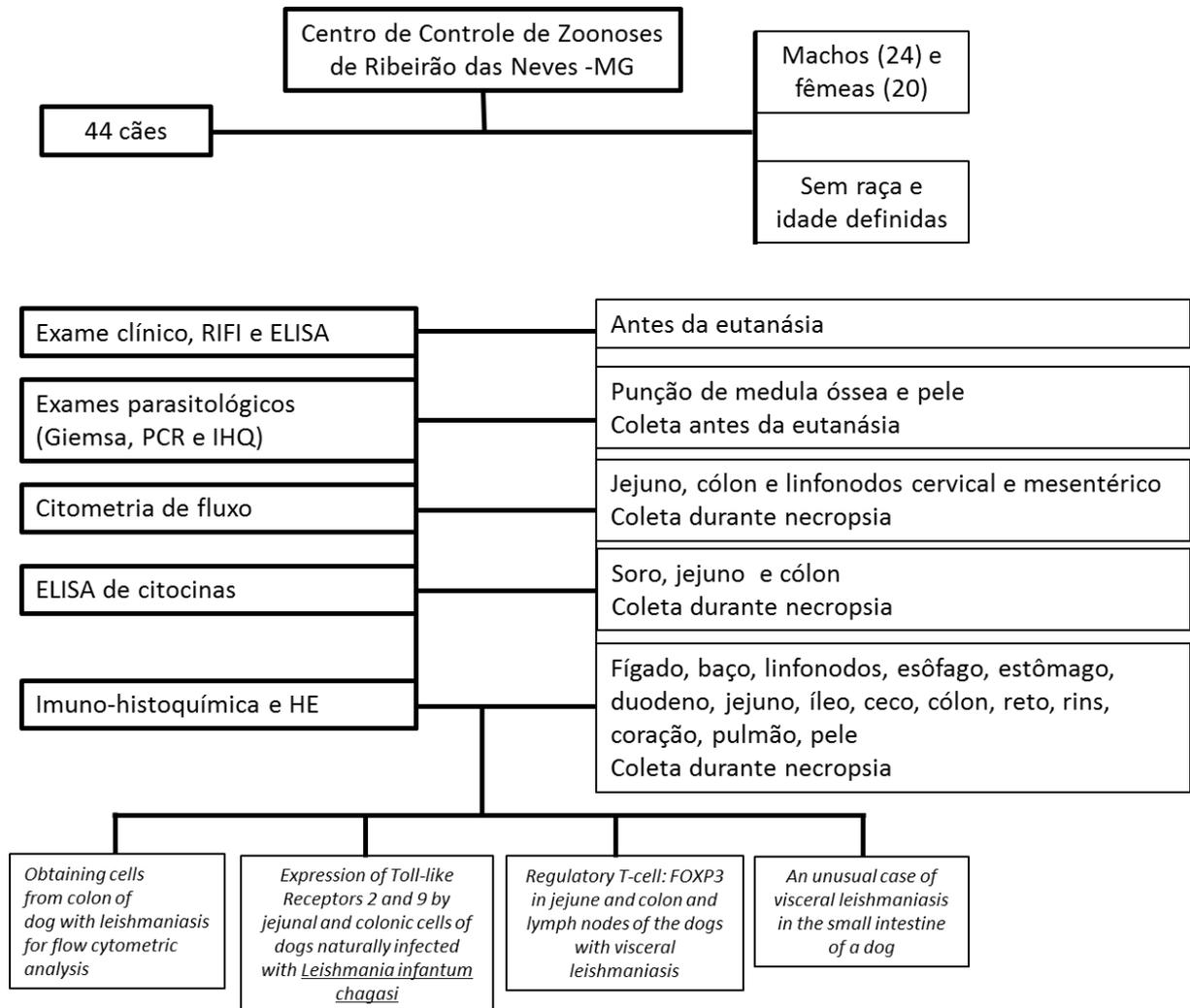
Teste *t* de *Student* foi empregado para comparar um mesmo evento entre dois grupos, por exemplo: comparação da expressão de um determinado receptor entre cães positivos e cães negativos.

Teste de correlação de Pearson: foi o teste usado para determinar a unidade de medida numérica cujos valores poderiam variar entre os eventos, e assim determinar se as amostras indicavam correlação direta ou se variavam no mesmo sentido (positiva) ou inversa (negativa). Em suma, foi utilizado para avaliar a intensidade de associação existente entre duas variáveis quantitativas. Por exemplo: se parasitismo e reação inflamatória variavam no mesmo sentido ou se variavam inversamente.

Teste Friedman foi empregado para avaliar todos os parâmetros desejados, entre dois segmentos do mesmo indivíduo, ou seja, utilizado para avaliar a diferença entre dois grupos de amostras dependentes, por exemplo: avaliar a expressão do receptor CD11b entre jejuno e cólon dos mesmos cães.

Teste Mann Whitney foi usado para comparações do mesmo segmento, porém entre grupos diferentes. Por exemplo: avaliar se o linfonodo mesentérico de cães negativos apresentavam mais CD4<sup>+</sup> em relação aos cães positivos.

## 6 DESENHO EXPERIMENTAL



## 7 RESULTADOS

### 7.1 Resultados preliminares

Antes de iniciar as análises dos 44 cães com LV selecionados para esse trabalho foi feito um estudo com material do acervo do LPL (biópsias de TGI emblocadas em parafina de 20 cães) incluindo segmentos tais como estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon com finalidade de obter resultados preliminares sobre infecção intestinal em cães com LV. As amostras foram obtidas de cães do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Ribeirão das Neves, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. Dessas amostras foram feitas a coloração HE e a reação IHQ.

À análise dos prontuários (anamnese) observou-se que a macroscopia dos segmentos revelou não haver alterações em qualquer parte do TGI nos cães incluídos nesse estudo. No entanto, cerca de cinco cães (20%) continham helmintos associados à hiperemia focal, mas não se notou hemorragias ou úlceras. Já a observação microscópica revelou aumento, ora focal ora difuso, do número de células em todas as camadas do TGI (lâmina própria, submucosa e muscular da mucosa), em comparação com os cães não infectados. Um exsudato celular crônico foi observado em todos os casos, composto predominantemente por macrófagos, plasmócitos e linfócitos com raros neutrófilos ou eosinófilos (FIG. 4 A - E). Macrófagos continham formas amastigotas de *Leishmania* e frequentemente apresentavam morfologia peculiar caracterizado por citoplasma claro e abundante e núcleo com cromatina frouxa, característico de células epitelióides (FIG. 4 F e G). Células gigantes multinucleadas e células epitelióides (FIG. 4 H) foram associadas a áreas de maior celularidade, todavia nenhuma reação granulomatosa típica foi evidente na lâmina própria. Observou-se que embora a carga parasitária estivesse alta, não foi visto erosões ou úlceras nas camadas epiteliais da mucosa. Na verdade, independente do estado clínico dos cães, a análise microscópica revelou formas amastigotas de *Leishmania* em todas as camadas do TGI, em particular nos macrófagos da lâmina própria (FIG. 5 A - D). Houve carga parasitária superior nos segmentos ceco e cólon em relação aos outros como visto na Tabela 2, sem diferença estatística entre animais sintomáticos e assintomáticos, o que demonstra a Tabela 3. Tanto nos animais assintomáticos, quanto nos sintomáticos, a maioria dos parasitos se concentrava no cólon, seguido do ceco, Tabelas 4 e 5, respectivamente. Esses resultados foram publicados na revista *Acta Veterinaria Scandinavica* (em anexo).

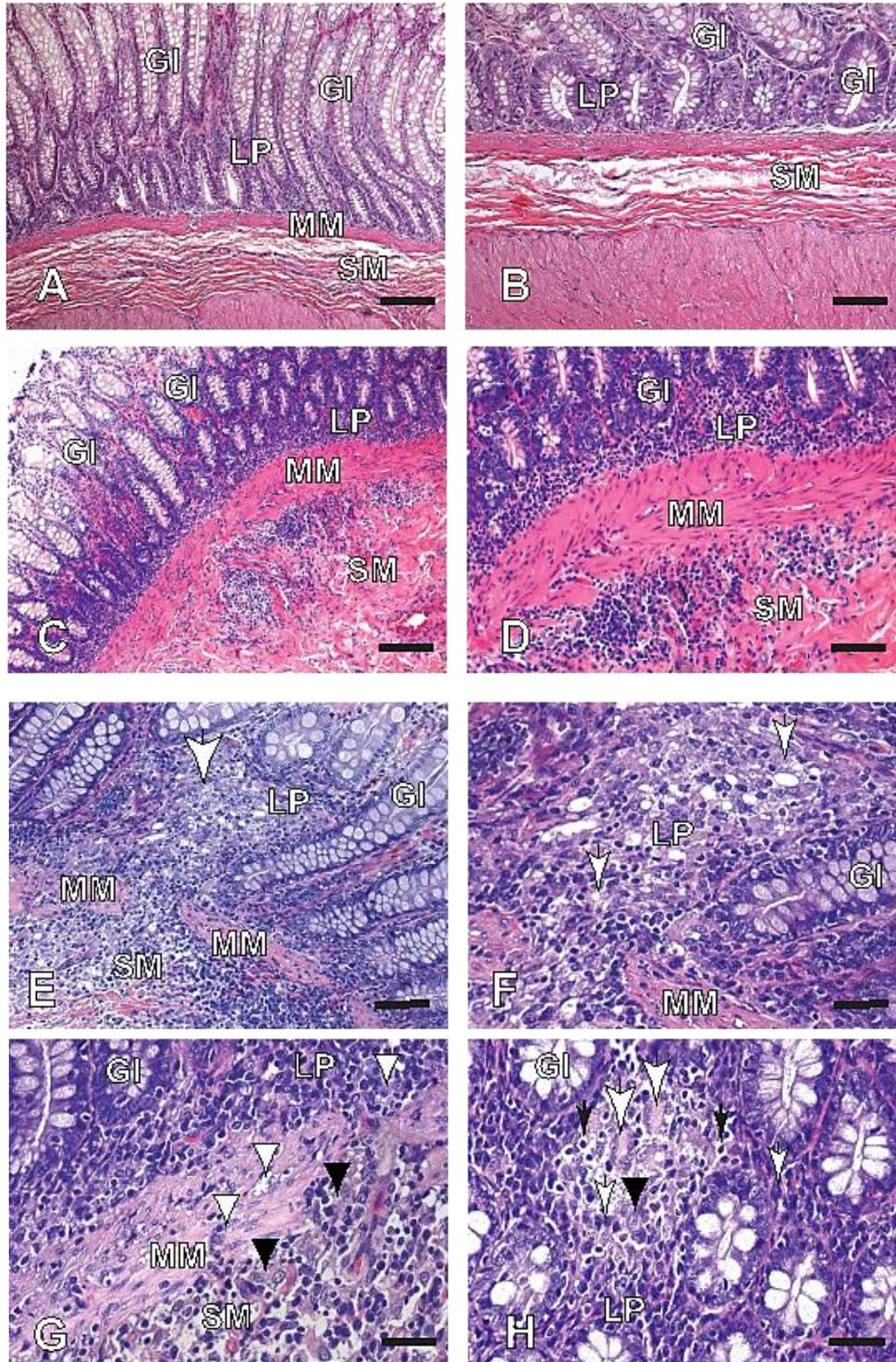
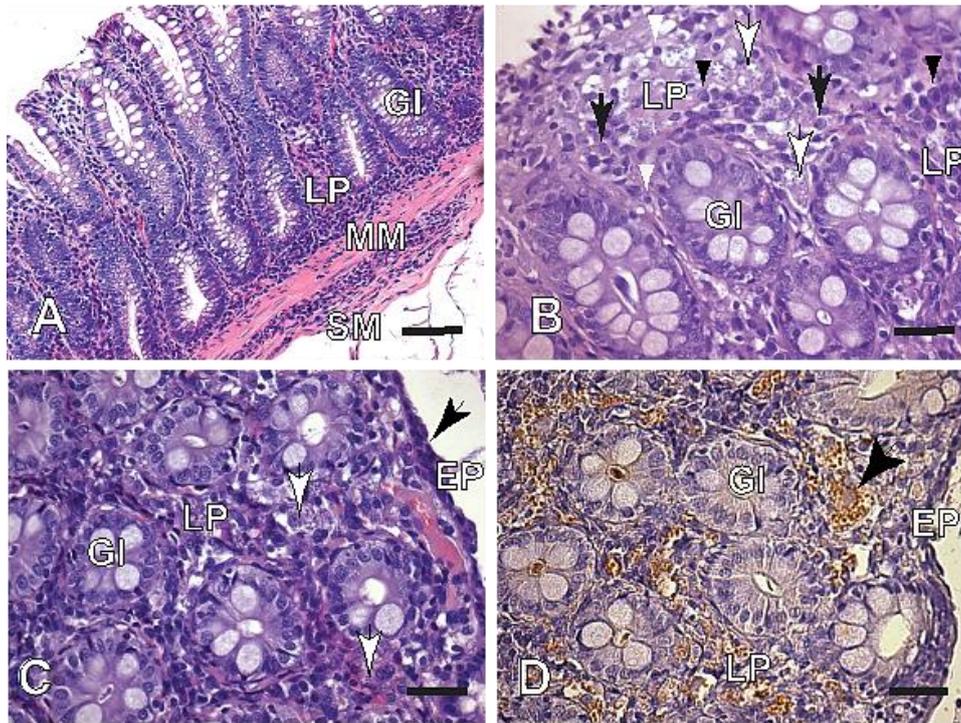


Figura 4 - Micrografias de ceco de cão: A e B = cão não infectado; C - H = cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*; (A e B) observar imagem histológica normal da mucosa (lâmina própria) muscular da mucosa e submucosa (HE, barras = 62  $\mu$ m e 32  $\mu$ m, respectivamente); (C e D) observar aumento da celularidade nas camadas gastrointestinais (HE, barras = 62  $\mu$ m e 32  $\mu$ m, respectivamente); (E) aumento do número de células de todas as camadas gastrointestinais onde o exsudato foi focal (seta branca) (HE, barra = 32  $\mu$ m); (F e G) imagem anterior em maior aumento: em (F), note macrófagos parasitados na lâmina própria (setas brancas), (barra = 16  $\mu$ m) e em (G) observar macrófagos parasitados com *Leishmania* na muscular da mucosa (setas brancas) e submucosa (pontas de setas pretas) (barra = 16  $\mu$ m); (H) células gigantes multinucleadas (seta branca) e células epitelióides (seta preta) associadas ao exsudato mononuclear na lâmina própria (HE, barra = 16  $\mu$ m); LP: lâmina própria, MM: muscular da mucosa; SM: submucosa; GI: Glândulas intestinais e HE: Hematoxilina-Eosina.



**Figura 5 -** Micrografias de cólon de um cão assintomático naturalmente infectado com *L. infantum*: (A) vista panorâmica da mucosa (lâmina própria), muscular da mucosa e submucosa do cólon demonstrando exsudato celular intenso e difuso (HE, barra = 32 $\mu$ m); (B) maior ampliação mostrando células mononucleares representadas por macrófagos parasitados com *Leishmania* (seta branca) ou não (seta preta), linfócitos e células plasmáticas (pontas de setas pretas) sem úlceras ou erosões do epitélio (HE, barra = 16 $\mu$ m); (C) mucosa mostrando aumento da celularidade: macrófagos com *Leishmania* podem ser observados (setas brancas) (HE, barra = 16 $\mu$ m); (D) micrografia mostrando carga parasitária elevada, observar macrófagos hipertróficos parasitados (seta preta), (Estreptoavidina-peroxidase, barra = 16 $\mu$ m). LP: lâmina própria; MM: muscular da mucosa; SM: submucosa; GI: Glândulas intestinais e HE: Hematoxilina-Eosina.

**TABELA 2 -** Frequência de formas amastigotas de *Leishmania* no trato gastrointestinal (TGI) de cães sintomáticos e assintomáticos naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* do Município de Ribeirão das Neves, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG).

Fragmentos do TGI	Frequência (n = 20)	
	Assintomático (n = 9)	Sintomático (n = 11)
Estômago	3 (33,3%)	1 (9,0%)
Duodeno	4 (44,4%)	6 (54,5%)
Jejuno	5 (55,5%)	7 (63,6%)
Íleo	5 (55,5%)	7 (63,6%)
Ceco	8 (88,8%)	9 (81,8%)
Cólon	6 (66,6%)	10 (90,9%)

**TABELA 3 - Análise morfométrica ( $\mu\text{m}^2$ ) para quantificar as formas amastigotas de *Leishmania* no trato gastrointestinal (TGI) de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* do Município de Ribeirão das Neves, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG).**

Fragmentos do TGI	Estado clínico (n = 20)		Análise estatística ( <i>Mann Whitney Test</i> )
	Assintomático	Sintomático	(p < 0,05)
Estômago	0,21	0,15	0,9671
Duodeno	0,22	0,43	0,4029
Jejuno	0,10	0,05	0,6474
Íleo	0,04	0,13	0,2443
Ceco	0,76	3,03	0,7725
Cólon	0,41	4,73	0,1165

**TABELA 4 - Análise morfométrica ( $\mu\text{m}^2$ ) para quantificar as formas amastigotas de *Leishmania* no trato gastrointestinal de cães assintomáticos naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* do Município de Ribeirão das Neves, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG).**

Fragmentos do TGI	Pixels/ $\mu\text{m}^2$	Fragmentos do TGI	Pixels/ $\mu\text{m}^2$	Análise estatística ( <i>Friedman test</i> ) (p < 0,05)
Estômago	0,21	Duodeno	0,22	0,3383
Estômago	0,21	Jejuno	0,11	0,4911
Estômago	0,21	Íleo	0,04	0,3678
Estômago	0,21	Ceco	0,76	0,2475
Estômago	0,21	Cólon	0,41	0,9579
Duodeno	0,22	Jejuno	0,10	0,5577
Duodeno	0,22	Íleo	0,04	0,7091
Duodeno	0,22	Ceco <sup>+</sup>	0,76	0,0354*
Duodeno	0,22	Cólon	0,41	0,2892
Jejuno	0,10	Íleo	0,04	0,5589
Jejuno	0,10	Ceco <sup>+</sup>	0,76	0,0403*
Jejuno	0,10	Cólon	0,41	0,5607
Íleo	0,04	Ceco <sup>+</sup>	0,76	0,0180*
Íleo	0,04	Cólon	0,41	0,2667
Ceco	0,76	Cólon	0,41	0,2928

\* Diferença estatística = (p < 0,05)

<sup>+</sup> Ceco alberga mais parasito

**TABELA 5 - Análise morfométrica ( $\mu\text{m}^2$ ) para quantificar as formas amastigotas de *Leishmania* no trato gastrointestinal de cães sintomáticos naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* do Município de Ribeirão das Neves, região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG).**

Fragmentos do TGI	Pixels/ $\mu\text{m}^2$	Fragmentos do TGI	Pixels/ $\mu\text{m}^2$	Análise estatística ( <i>Friedman test</i> ) ( $p < 0,05$ )
Estômago	0,15	Duodeno	0,43	0,4687
Estômago	0,15	Jejuno	0,05	0,1387
Estômago	0,15	Íleo	0,05	0,6451
Estômago	0,15	Ceco	0,05	0,0761
Estômago	0,15	Cólon <sup>+</sup>	0,05	0,0302*
Duodeno	0,43	Jejuno	0,05	0,7917
Duodeno	0,43	Íleo	0,13	0,6919
Duodeno	0,43	Ceco	3,03	0,0565
Duodeno	0,43	Cólon <sup>+</sup>	4,73	0,0138*
Jejuno	0,05	Íleo	0,13	0,3912
Jejuno	0,05	Ceco <sup>+</sup>	3,03	0,0125*
Jejuno	0,05	Cólon <sup>+</sup>	4,73	0,0031*
Íleo	0,13	Ceco <sup>+</sup>	3,03	0,0486*
Íleo	0,13	Cólon <sup>+</sup>	4,73	0,0417*
Ceco	3,03	Cólon	4,73	0,6457

\* Diferença estatística = ( $p < 0,05$ )

<sup>+</sup> Ceco e cólon albergam mais parasitos

## 7.2 Padronização da técnica de citometria para células de mucosa intestinal de cão

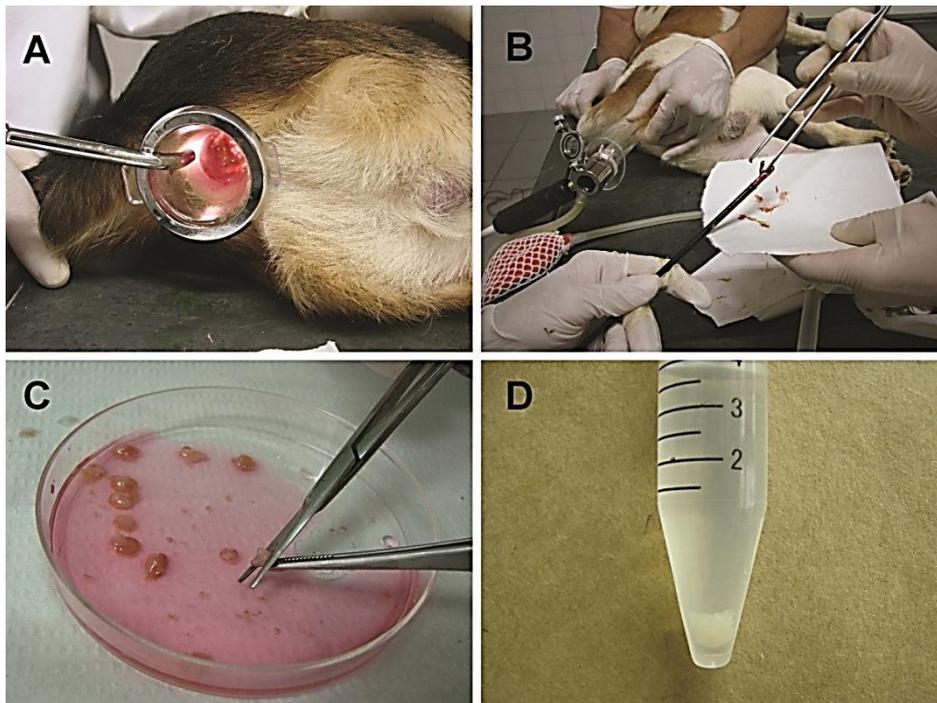
Com o intuito de padronizar a técnica de citometria de fluxo nas células da lâmina própria de intestino de cão, biópsias de cólon foram coletadas por colonoscopia (FIG. 6 A) em doze cães (seis negativos e seis positivos para LV). Essa técnica foi utilizada para avaliar frequência e IMF de receptores presentes em linfócitos e macrófagos de células da lâmina própria do jejuno e cólon.

Observou-se que a rapidez com que foi feito o isolamento das células (imediatamente após a coleta da amostra) (FIG. 6 B e C), favoreceu a quantidade e a viabilidade das células. A agilidade nesse processo é fundamental, visto que o uso de enzimas no decorrer do procedimento de isolamento das células de um tecido, altera a expressão de antígenos celulares de modo que a subsequente análise pelo FACS (*Fluorescência-Activated Cell Sorting*) pode não refletir com fidelidade a percentagem real de células na suspensão.

A incubação dos fragmentos com colagenase do tipo II foi mais eficaz quando feita por 45 minutos. Em um período inferior a esse o isolamento das células não foi eficaz e quando superior houve considerável morte celular. O número resultante de células da lâmina própria variou entre  $2 \times 10^5$  -  $10^8$  células para cada poço em uma massa de 40mg por amostra

(FIG. 6 D). Quantidade inferior a 40mg de tecido não resultaram em quantidade de células suficientes para fazer a aquisição. Foi observado que o isolado de células de tecidos de cães infectados não diferiu do isolado de cães controle, tanto na quantidade quanto na viabilidade das células. Não foi observado diferença nesses parâmetros entre cães machos e fêmeas. A colagenase do tipo I não foi eficiente na obtenção de células de biópsias de intestino de cão como o é de intestino de camundongos.

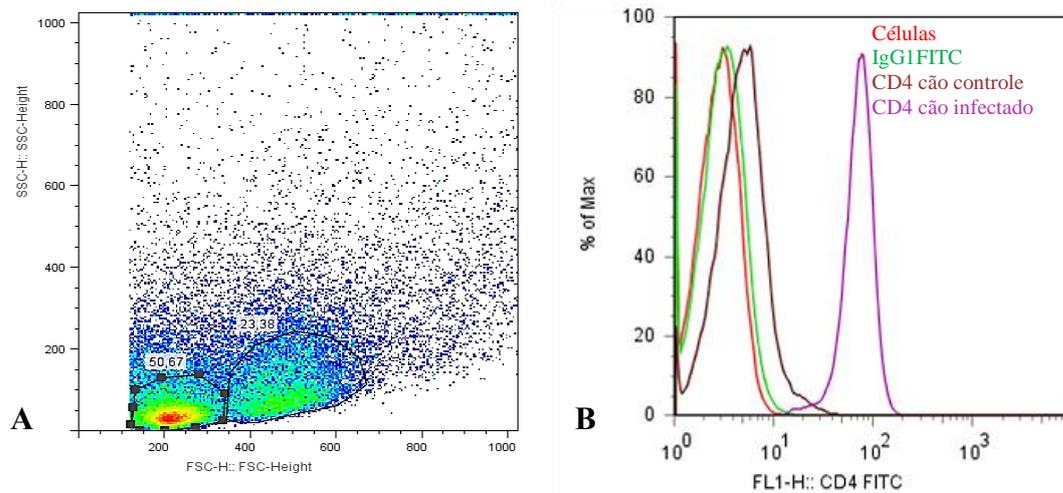
Como demonstrado na FIG. 7 A foi possível identificar as células pelas suas propriedades SSC/FSC, apesar da contaminação com células epiteliais e detritos que são comuns em isolado celular de mucosa. Os aspectos fenotípicas das células foram expressados em duas formas diferentes: porcentagem de células expressando um dado receptor e intensidade média de fluorescência, como se vê na FIG. 7 A e B.



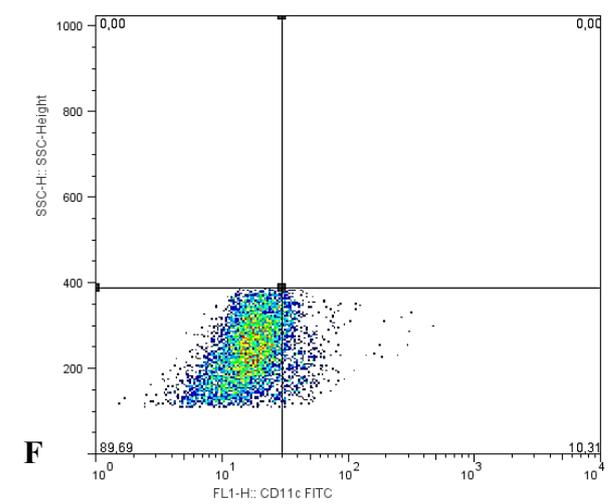
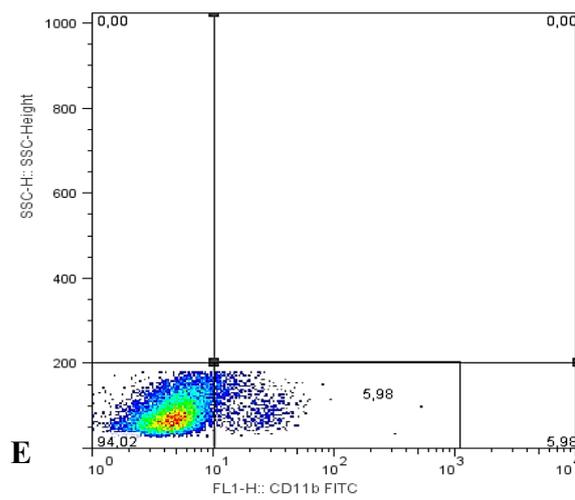
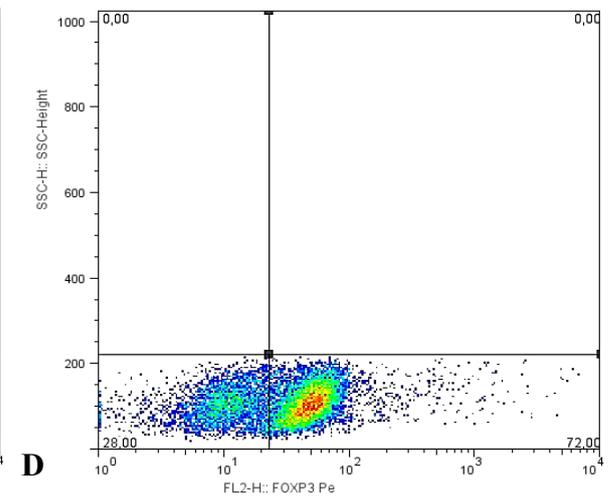
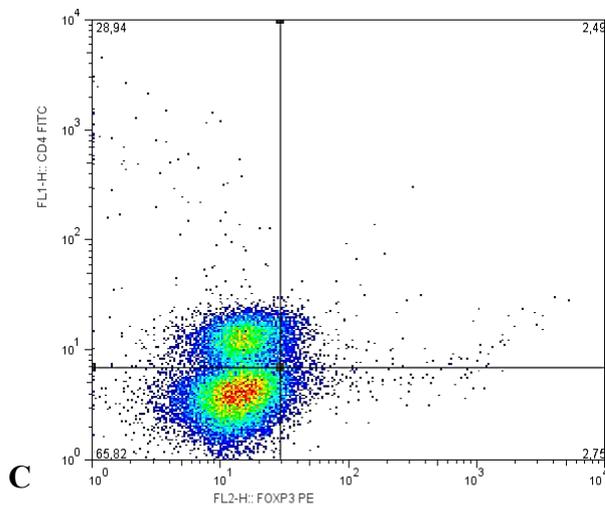
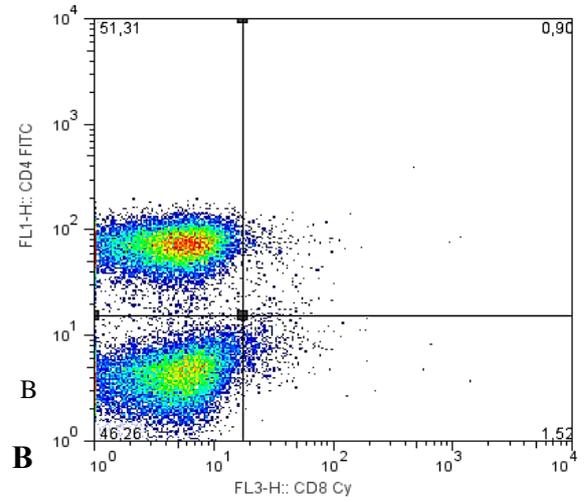
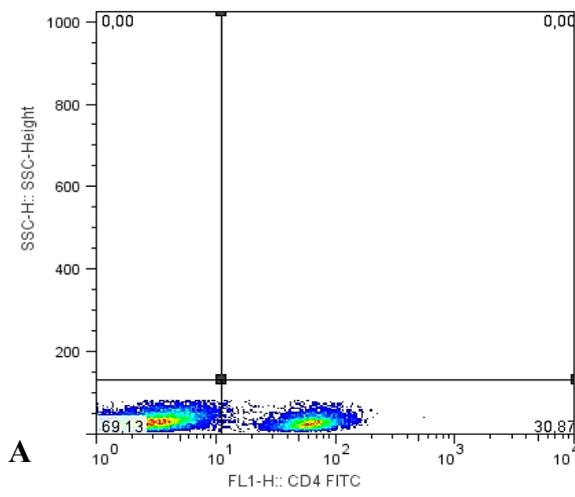
**Figura 6 - (A) fotografia da colonoscopia feita em cães previamente anestesiados; (B) biópsias de cólon para os ensaios (massa de 40 mg de tecido); (C) fragmentos sendo lavados em meio RPMI<sup>®</sup> para remover resíduos fecais e gordura; (D) células obtidas das biópsias.**

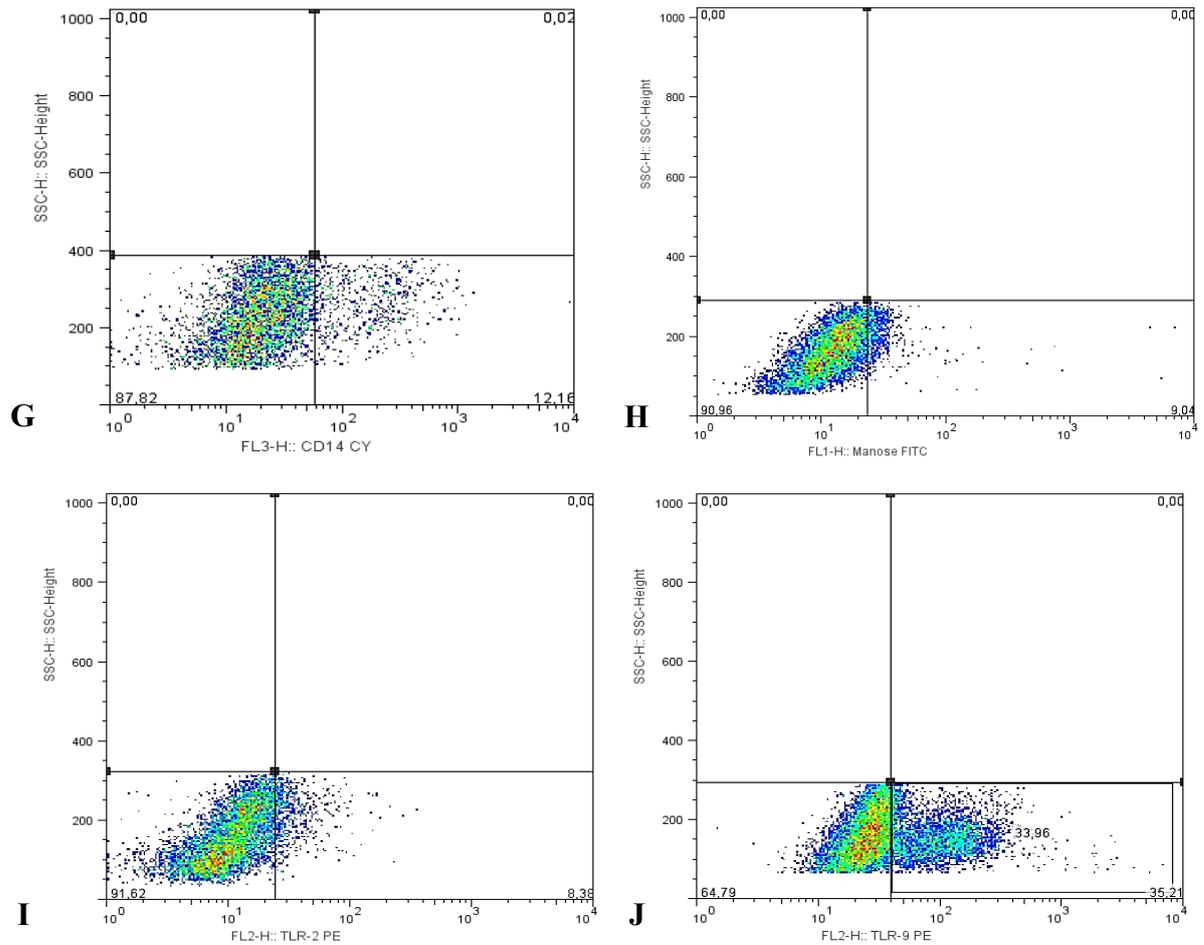
A análise das células obtidas (FIG. 8 A - J) possibilitou comparações diversas envolvendo a lâmina própria intestinal em diferentes grupos. Em nosso estudo, a expressão e a frequência de alguns receptores nas células da lâmina própria revelaram-se diferentes entre cães controle e infectados (GRAF. 1 A e B). Demonstramos, portanto um protocolo que pode

ser útil para estudos de marcadores celulares intestinais. A técnica aqui utilizada mostrou que a presença de parasitos no intestino de cães infectados com *L. infantum chagasi* está correlacionada às alterações nos parâmetros imunológicos e na imunorregulação, uma vez que esses parasitos sobrevivem e se multiplicam no microambiente da mucosa intestinal e não parece danificar o hospedeiro. O protocolo completo e seus resultados foram publicados na revista online Nature Protocols Exchange (em anexo).

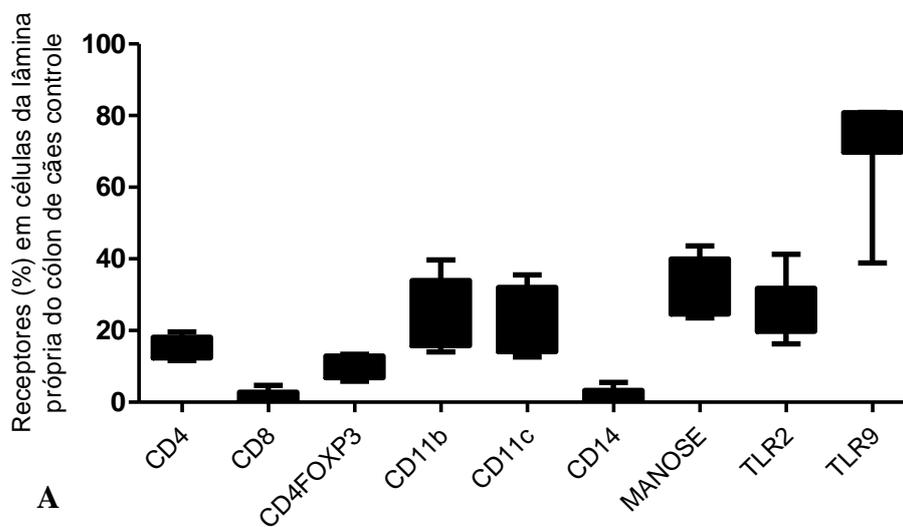


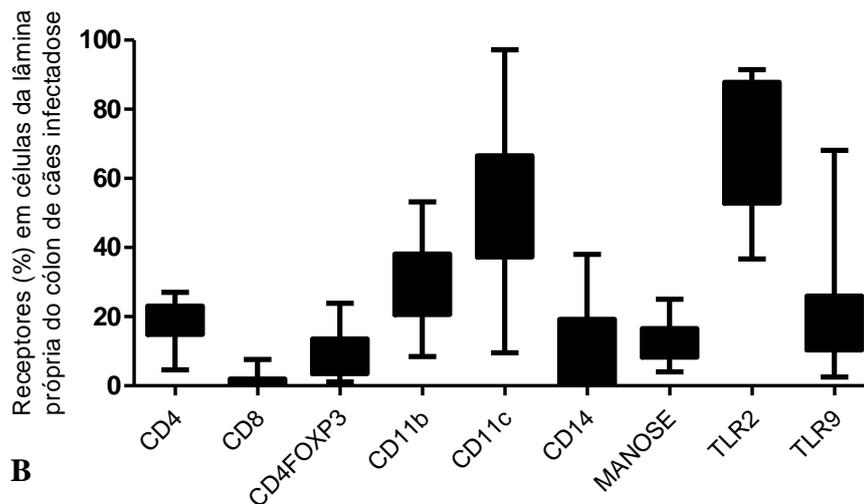
**Figura 7 - Identificação das células da lâmina própria pelas suas propriedades de tamanho e granulosidade: (A) gate representativo mostrando a delimitação da subpopulação de macrófagos e linfócitos; (B) histograma representando intensidade média de fluorescência de CD4<sup>+</sup> no cólon de cães controle e infectados e utilizando isotipo anti-IgG1, A40-12OP8, Imgenex ®.**





**Figura 8 - Gráficos demonstrando análise por citometria de fluxo (frequência (%)):** (A) células CD4<sup>+</sup>; (B) células CD8<sup>+</sup>; (C) células CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>; (D) células FOXP3<sup>+</sup>; (E) células CD11b<sup>+</sup>; (F) células CD11c<sup>+</sup>; (G) células CD14<sup>+</sup>; (H) Manose<sup>+</sup>; (I) células TLR2<sup>+</sup>; (J) células TLR9<sup>+</sup>.



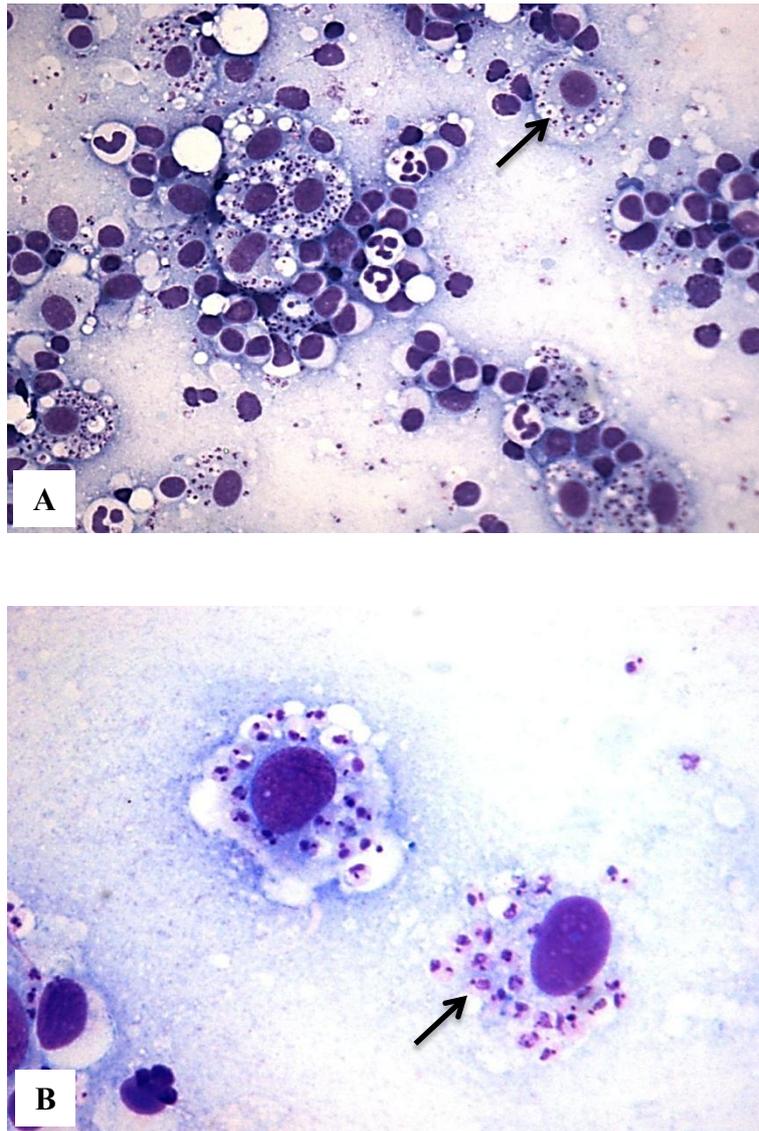


**Gráfico 1 - Comparação entre a frequência de receptores de células da lâmina própria no cólon de cães controle e infectados com *L. infantum chagasi*: (A) cães controle; (B) cães infectados.**

Os resultados supracitados resultaram em artigos já publicados, tanto os da análise de biópsias de TGI do acervo do LPL: “*Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with Leishmania infantum*” quanto os da padronização da citometria de fluxo em células intestinais: “*Obtaining cells from colon of dog with leishmaniasis for flow cytometric analysis*”. Apresentam-se a seguir os resultados referentes aos 44 cães selecionados para esse trabalho.

### 7.3 Resultados dos exames parasitológicos e sorológicos antes da necropsia

Sabe-se que o diagnóstico da leishmaniose pode ser feito por identificação direta - visualização das formas amastigotas do protozoário em aspirados de medula óssea, em biópsia de baço ou fígado, assim como de pele, seja pela reação IHQ seja por Giemsa. Além da visualização direta do parasito por essas técnicas, o emprego da sorologia e da biologia molecular para qualificar ou quantificar dados da infecção são comumente usados. Nesse trabalho, nas amostras de medula óssea, identificamos facilmente os parasitos em todos os cães avaliados com carga parasitária alta (FIG. 9 A e B).



**Figura 9 –** Micrografias de medula óssea coradas por Giemsa, de dois cães provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) cão assintomático, objetiva de 40; (B) cão sintomático, objetiva de 100; seta apontando as amastigotas.

Nas biópsias de pele de orelha, observamos, por IHQ, positividade em todas as biópsias (FIG. 10 A e B) e, por PCR, observamos DNA de *Leishmania* em todas as amostras selecionadas (FIG. 11).

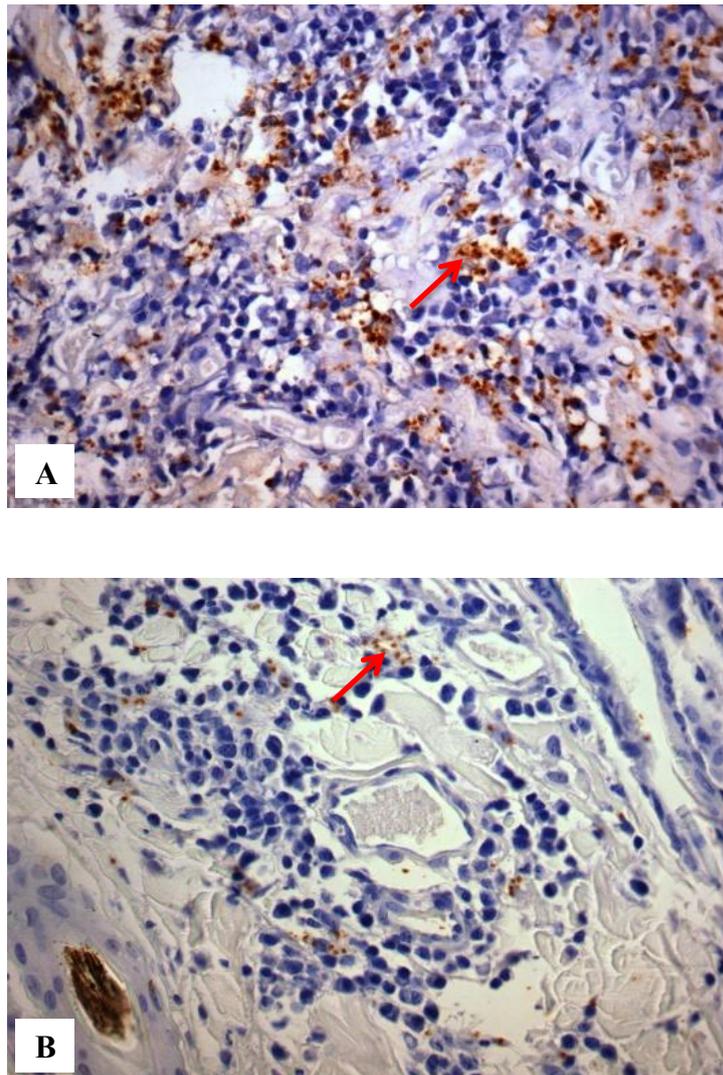


Figura 10 – Micrografias apontando amastigotas (setas) em amostras de pele, marcadas por IHQ, de dois cães provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) cão assintomático (objetiva de 40); (B) cão sintomático (objetiva de 40).

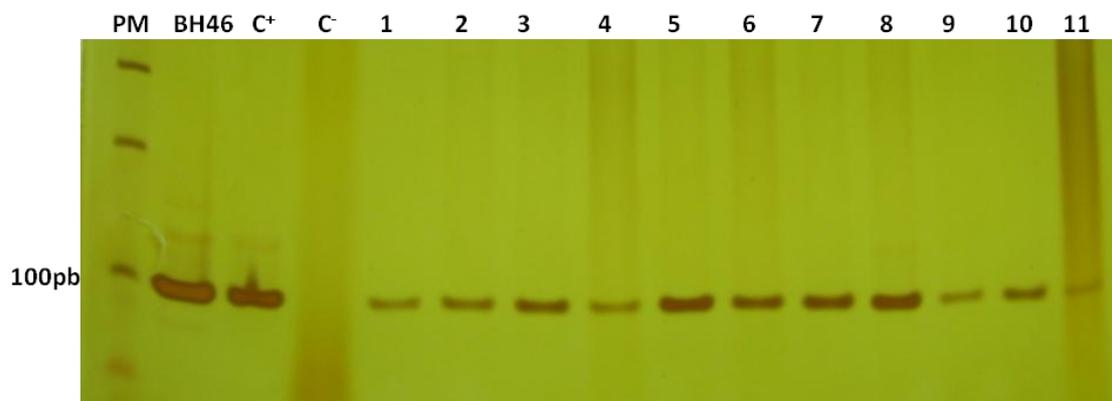
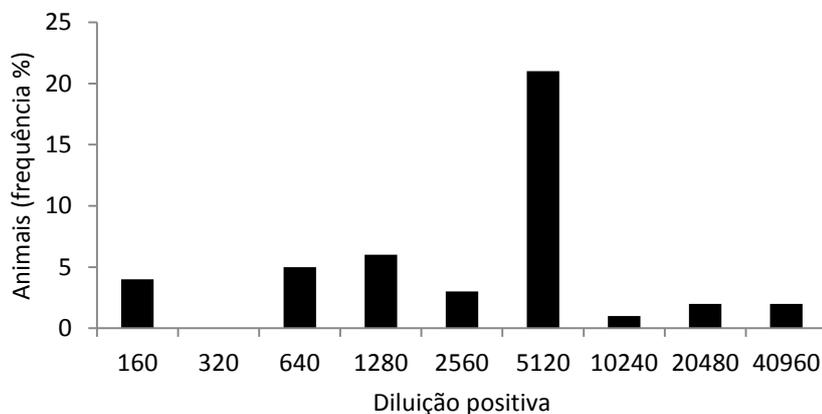


Figura 11 - Fotografia de gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da PCR convencional com os iniciadores LV1 e LV2 para o complexo *Leishmania donovani*, que amplificam um fragmento de 100pb. Canaletas 1-11: amostras de tecido da orelha dos cães diagnosticados como positivos por imuno-histoquímica, ELISA e RIFI; PM = padrão de massa molecular de 100pb; BH46 = 1ng de DNA de promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1967?BH46); C<sup>+</sup> = amostra de cão positivo (controle positivo); C<sup>-</sup> = amostra de cão negativo (controle negativo).

Quanto aos exames sorológicos, houve concordância de 100% e correlação moderada positiva entre os testes de ELISA e RIFI ( $r^2 = 0,492$ ;  $p < 0,005$ ). A reatividade final dos soros dos 44 animais, determinada pelo teste de RIFI, variou da menor diluição positiva de 1:160 até a maior diluição de 1:40960 e está demonstrada no GRAF. 2. A reatividade média dos soros, determinada pela técnica de ELISA foi de  $0,640 \pm 0,199$ ; com variação entre 0,169 para o menor valor e 1,01 para o maior valor. O *cut-off* médio das placas foi de  $0,100 \pm 0,010$ . Houve concordância de 100% em relação ao diagnóstico sorológico prévio realizado pelo CCZ de Ribeirão das Neves.

Somente os animais positivos para todos esses testes citados (ELISA, IHQ, PCR, RIFI) foram usados nesse trabalho.

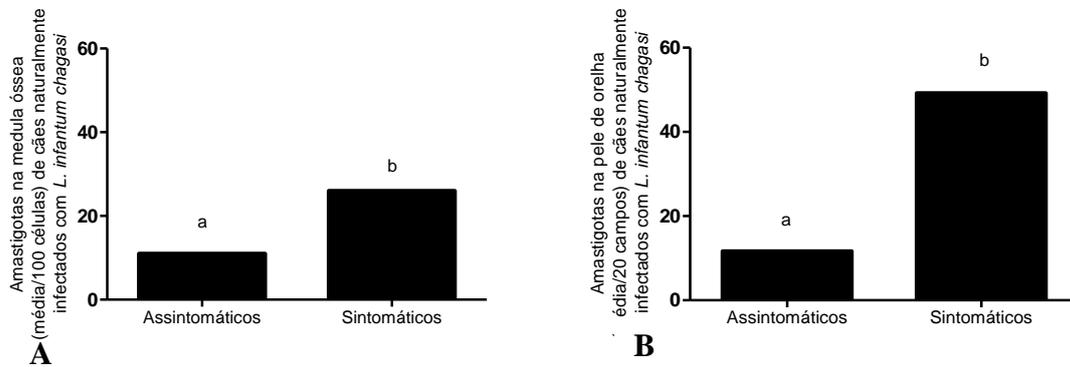


**Gráfico 2 - Distribuição percentual dos resultados da recíproca da diluição reativa final dos soros de 44 cães provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG determinada pela RIFI.**

#### **7.4 Avaliação da densidade parasitária antes da necropsia**

Na medula observamos parasitismo em todas as amostras de cães positivos para leishmaniose. Nos animais assintomáticos a média foi de 11/100 *Leishmanias*/células mononucleares ao passo que nos animais sintomáticos a média foi de 26/100 *Leishmanias*/células mononucleares (GRAF. 3 A). Houve diferença entre as médias ( $p = 0,0010$ ).

Na pele, pelo método morfométrico, quantificamos a carga parasitária em todas as amostras de cães positivos para leishmaniose. Nos animais assintomáticos a média foi de 11,7 *Leishmanias*/biópsia ao passo que nos animais sintomáticos a média foi de 49,2 *Leishmanias*/biópsia (GRAF 3 B). Houve diferença entre as médias ( $p = 0,0001$ ).

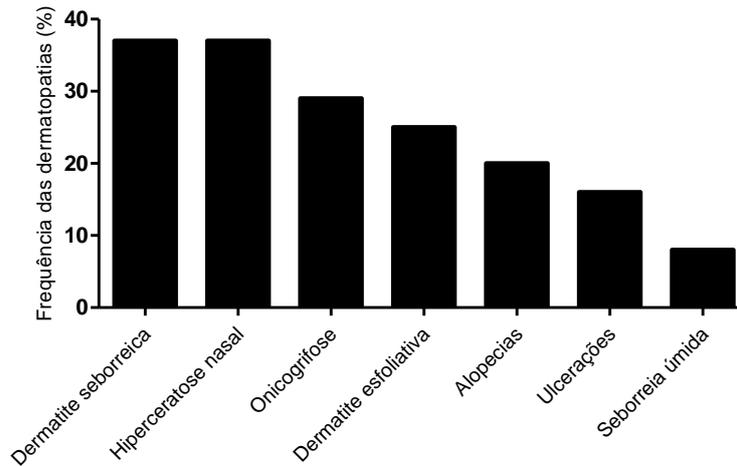


**Gráfico 3 - Carga parasitária tecidual em cães positivos para leishmaniose provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) média do número de amastigotas, determinada por Giemsa, na medula óssea, em 100 células, de 44 cães com *L. infantum chagasi* ( $p = 0,0500$ ); (B) média do número de amastigotas na pele, determinada por imuno-histoquímica, de 44 cães com *L. infantum chagasi* ( $p = 0,0050$ ). ; (letras diferentes equivalem a diferença estatística).**

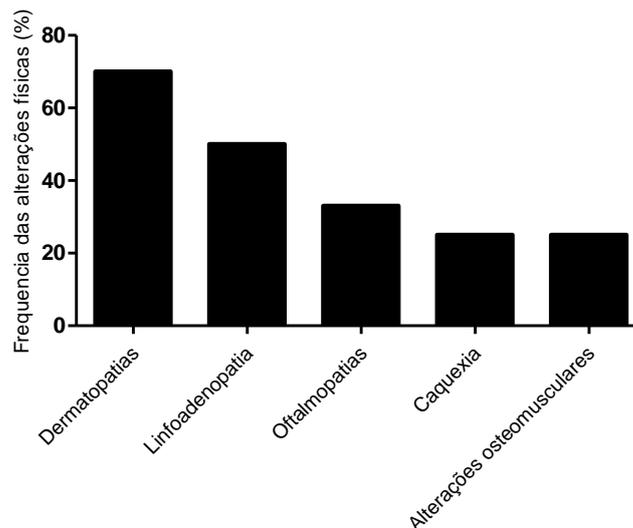
## 7.5 Avaliação clínica

Os animais do grupo controle e do grupo assintomático não apresentaram nenhum sinal clínico compatível com LV. Os 24 animais classificados como sintomáticos apresentaram pelo menos um sinal clínico relacionado à LVC, quando submetidos ao exame físico. A dermatopatia foi a principal alteração encontrada, onde 75% apresentaram algum tipo de acometimento do tecido cutâneo, com graus de gravidade variados. Dentre os cães que apresentaram dermatopatias mostraram associação de mais de um tipo de alteração, sendo a dermatite seborreica seca a mais frequente (37%) seguida de hiperqueratose do focinho e de proeminências ósseas (cotovelo, por exemplo) (36%), alopecias (20%) e dermatites esfoliativas (25%), onicogribose (29%), ulcerações (16%), e seborreias úmidas (8%) (GRAF. 4).

A linfadenomegalia foi observada em 12 cães (50%) e, dentre esses, na maioria dos casos foi identificado aumento nos linfonodos poplíteos (29%), seguido do aumento concomitante destes com os cervicais superficiais (50%). As oftalmopatias foram registradas em 8 cães (33%). Desses, a conjuntivite foi a mais frequente (16%), seguida por secreção mucopurulenta (33%), ceratoconjuntivite (8%) e úlcera de córnea (4%). Além dessas alterações citadas, vimos também caquexia (25%) caracterizada por ausência de gordura palpável, além de costelas, vértebras lombares e ossos da pélvis visíveis e alterações osteomusculares (25%) (GRAF. 5).



**Gráfico 4 - Frequência de alterações cutâneas relacionadas à leishmaniose visceral canina em 24 animais provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG, que apresentaram sinais clínicos no exame físico.**



**Gráfico 5 - Frequência de alterações relacionadas à leishmaniose visceral canina em 24 animais provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG que apresentaram sinais clínicos no exame físico.**

## 7.6 Macroscopia

As principais alterações macroscópicas observadas em todos os órgãos durante a necropsia se restringiram ao baço, fígado e linfonodos. No fígado foi observado aumento de peso e volume do órgão configurando hepatomegalia. Algumas vezes se apresentando com coloração vermelho escura, tumefeito e com superfície brancacenta e com elevações sugerindo fibrose. No baço observamos hipertrofia e hiperplasia, baseado no tamanho do órgão confirmado pelo peso relativo. Apresentaram-se rugosos com superfície irregular, quase

sempre associado à hipertrofia e espessura da cápsula, com cor brancacenta (numerosos pontos brancos difusamente distribuídos ao longo do órgão) e congestão. Os linfonodos poplíteos e cervicais foram facilmente palpáveis e à necropsia a superfície era lisa e brilhante e alguns com formações nodulares de coloração branco-amareladas. A média do peso relativo desses órgãos está na Tabela 6, demonstrando inclusive que cães sintomáticos tiveram peso significativamente maior em comparação aos assintomáticos e controles.

**TABELA 6 - Média do peso relativo (peso órgão/peso cão (Kg)) dos baços, fígados e linfonodos cervicais dos cães controle e dos cães naturalmente infectados por *L. infantum chagasi* dos grupos assintomáticos, sintomáticos e controles.**

Grupos	Média do peso relativo do baço	Média do peso relativo do fígado	Média do peso relativo do linfonodo
Controle	0,80	3,45	0,023
Assintomático	0,88	2,98	0,021
Sintomático	1,62*	5,35*	0,068*

\*Diferença ao nível de 5% de probabilidade pela análise de variância

O trato gastrointestinal, desde o esôfago até o reto, foi minuciosamente avaliado. As alterações observadas nos intestinos delgado e grosso de alguns animais foram sempre discretas caracterizadas por mucosas hiperêmicas talvez mais relacionadas à alimentação do que lesões. Todavia, com frequência, observou-se reatividade das placas de Peyer com nódulos de coloração brancacenta fazendo saliências na superfície do órgão (serosa) e especialmente no íleo, como demonstrado na Tabela 7.

**TABELA 7 - Avaliação macroscópica dos segmentos do trato gastrointestinal.**

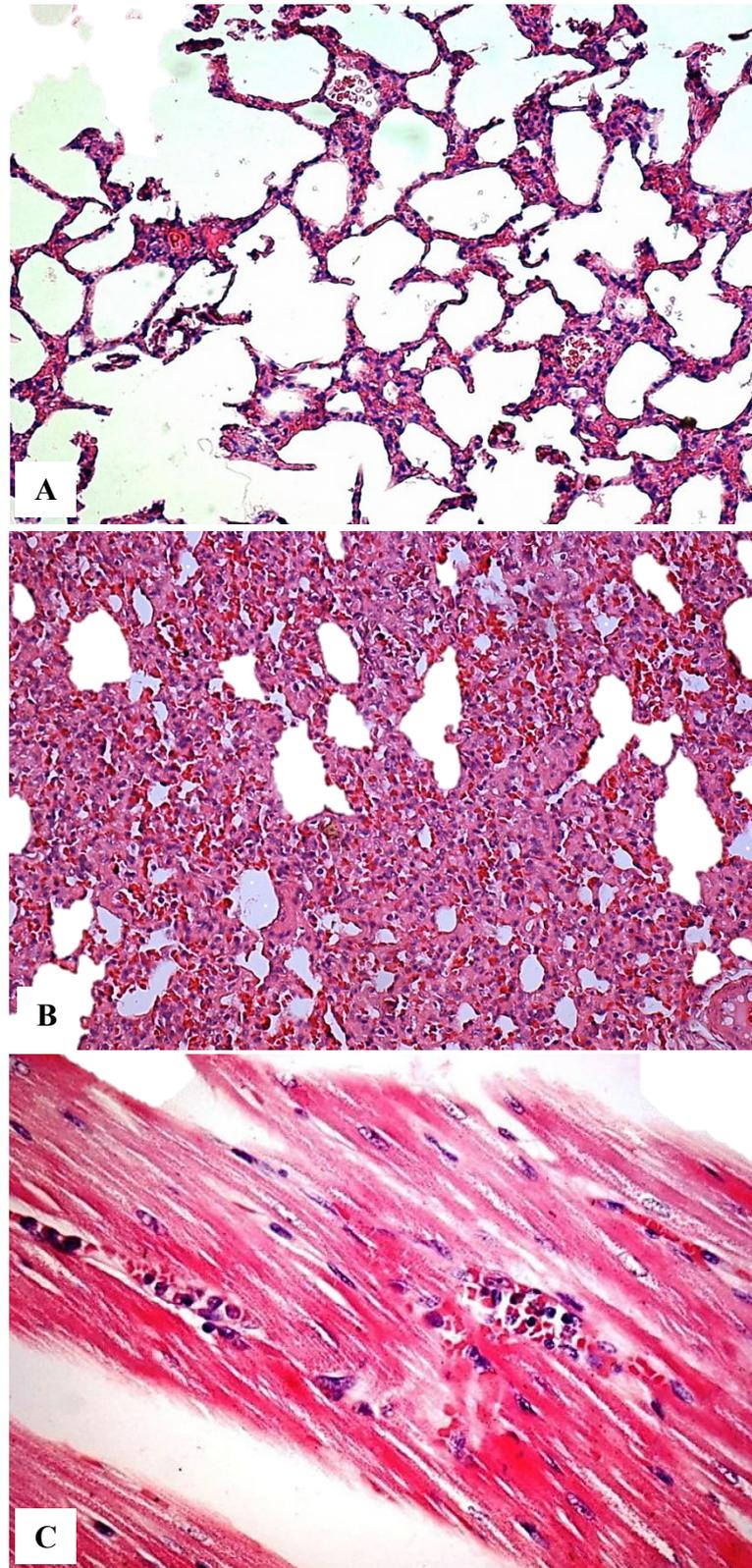
Alterações macroscópicas (durante necropsia)	Porcentagem n = 44	Assintomáticos (n = 20)	Sintomáticos (n = 24)
Parasitas	0%	-	-
Atrofia da parede intestinal	4,5%	1	1
Espessura aumentada da parede	6%	-	3
Hemorragia	0%	-	-
Enterite regional	4,5%	-	2
Hipertrofia das Placas de Peyer	60%	10	16
Hiperemia	12%	4	1

## 7.7 Microscopia e parasitismo tecidual

Análises histológicas dos órgãos fígado, baço, pele de orelha, linfonodos cervical e mesentérico, coração, pulmão e rins foram realizadas com o intuito de se ter uma visão sistêmica das lesões provocadas pela *Leishmania* nos cães selecionados para esse estudo.

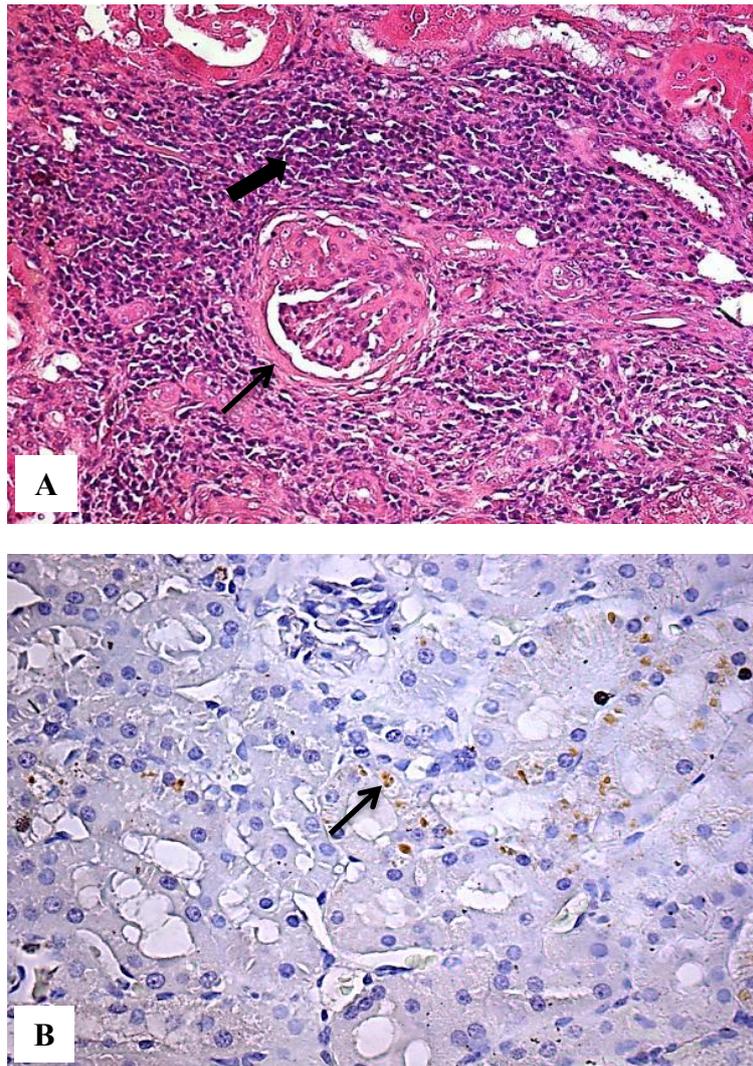
No pulmão a principal lesão observada foi inflamação intersticial difusa e crônica em 22% dos casos. Áreas de enfisema consistiram em ampliações anormais de alvéolos distais aos bronquíolos terminais, com evidência de destruição de suas paredes. A FIG. 12 A aponta para características de pulmão de cão não infectado ao passo que a FIG. 12 B aponta para pulmão de cão infectado ressaltando espessamento dos septos pulmonares à custa de exsudato plasmioistiolinfocitário (macrófagos - raramente parasitados, plasmócitos e linfócitos) observado em 18% dos casos. Focos inflamatórios na região subpleural foram caracterizados por acúmulos de macrófagos. Observamos amastigotas de *Leishmanias* em três casos (6%).

No coração não foi observado alterações teciduais. Formas amastigotas de *Leishmania* não foram encontradas (FIG. 12 C).



**Figura 12 -** Micrografias de pulmão e coração de cães controle e naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*: (A) pulmão de cão controle (HE, objetiva de 20); (B) micrografia de pulmão de cão infectado apresentando espessamento dos septos pulmonares associado ao exsudato plasmioistioinfocitário (HE, objetiva de 20); (C) micrografia de coração (HE, objetiva de 40).

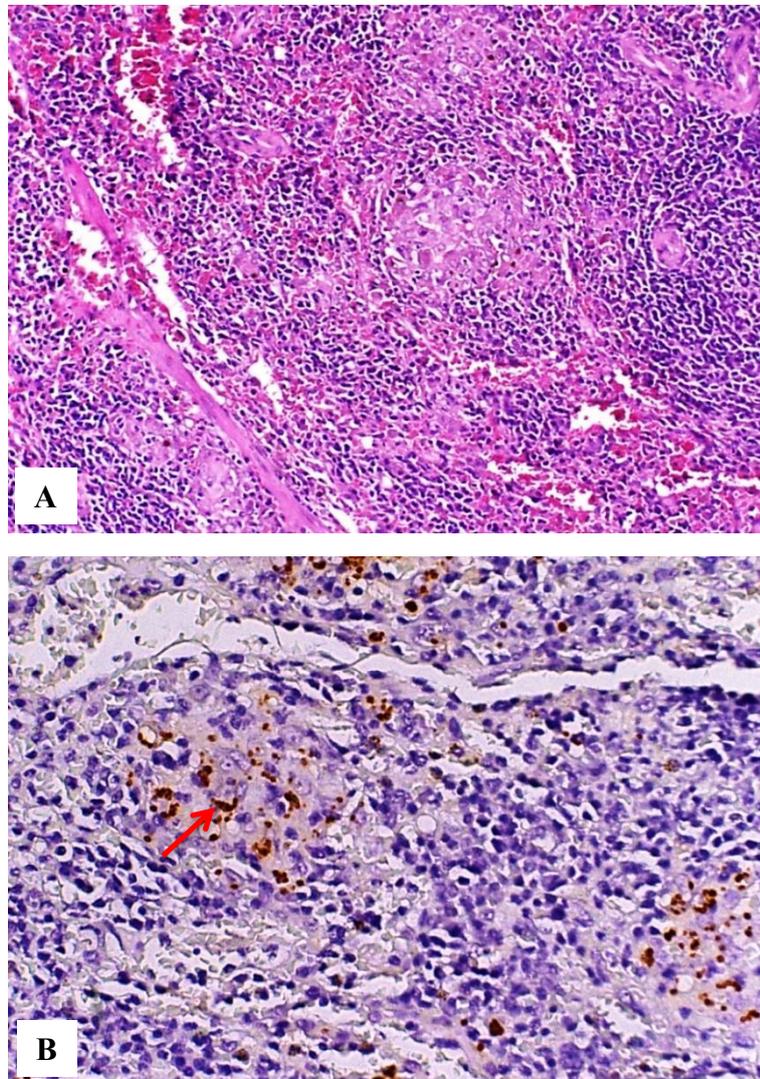
Nos rins observamos acúmulo de material eosinofílico na região mesangial, espessamento da cápsula de Bowman, atrofia de alguns glomérulos como consequência do processo inflamatório crônico caracterizado pela glomerulonefrite mesangioproliferativa em 48% dos casos. Além disso, foi observada nefrite intersticial focal crônica em 18% dos casos (FIG. 13 A). Alguns capilares glomerulares tinham suas paredes espessadas com deposição de material hialino. Observamos *Leishmanias* em nove casos (20%) (FIG. 13 B).



**Figura 13 -** Micrografia de rim de cão naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*: (A) note nefrite intersticial focal crônica (seta larga) associada à atrofia glomerular e glomerulonefrite mesangioproliferativa (seta fina) (HE, objetiva de 20); (B) micrografia de rim com amastigotas imunomarcadas (seta) (IHQ, objetiva de 40).

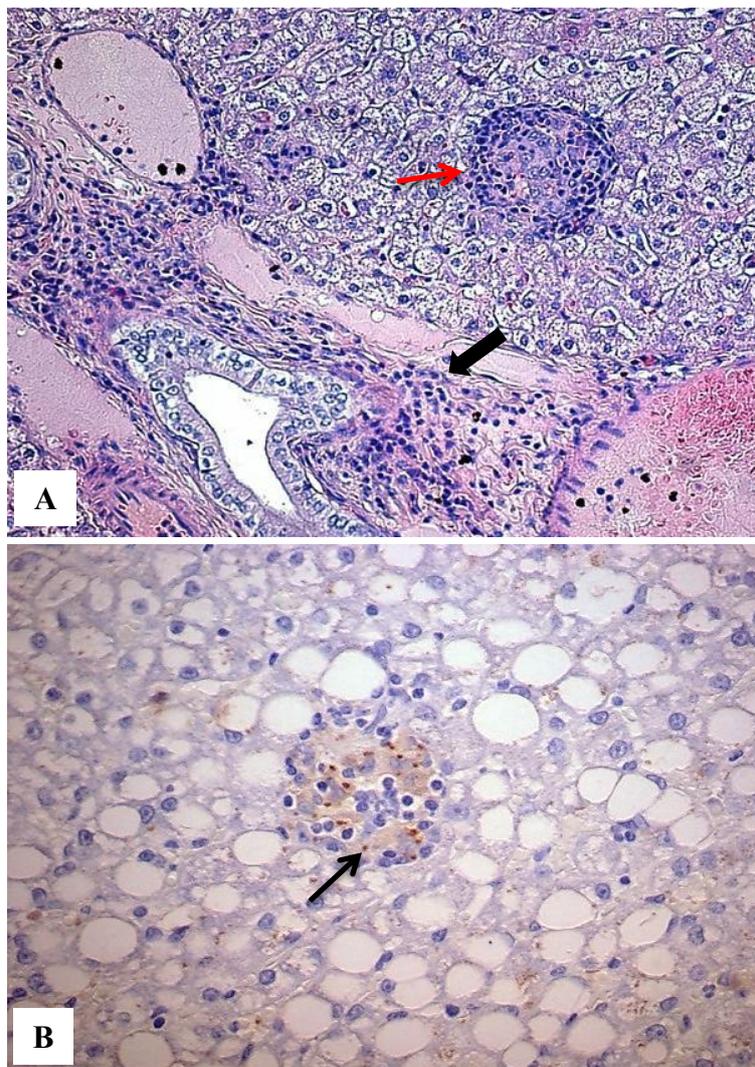
No baço (FIG. 14 A) foi notada discreta reação inflamatória na cápsula e região subcapsular. Os vasos da cápsula e os trabeculares estavam dilatados e congestionados. A polpa vermelha mostrou intensa fibroplasia da trabécula (cordões de Billroth), hipertrofia e

hiperplasia de macrófagos. Macrófagos epitelióides de citoplasma hipocorado, amplo e vesiculoso, parasitados ou não, foram encontrados na polpa vermelha e por vezes esboçando formação de granulomas (granuloma de Virchow). Observamos também deposição de pigmentos de hemossiderina como resultado da congestão esplênica. Apenas um cão não apresentou congestão de polpa vermelha, enquanto os demais apresentaram essa alteração variando entre discreta a moderada. Parasitos estavam presentes em 70% dos casos (FIG. 14 B). Não observamos diferença significativa do parasitismo entre cães assintomáticos e sintomáticos. A maioria dos cães apresentou hipertrofia e hiperplasia da polpa branca, exibindo característicos centros germinativos, com intensidade variando entre moderada e intensa. Em alguns cães (18%) ainda foi evidenciada ocorrência de discreta depleção de áreas T da polpa branca.



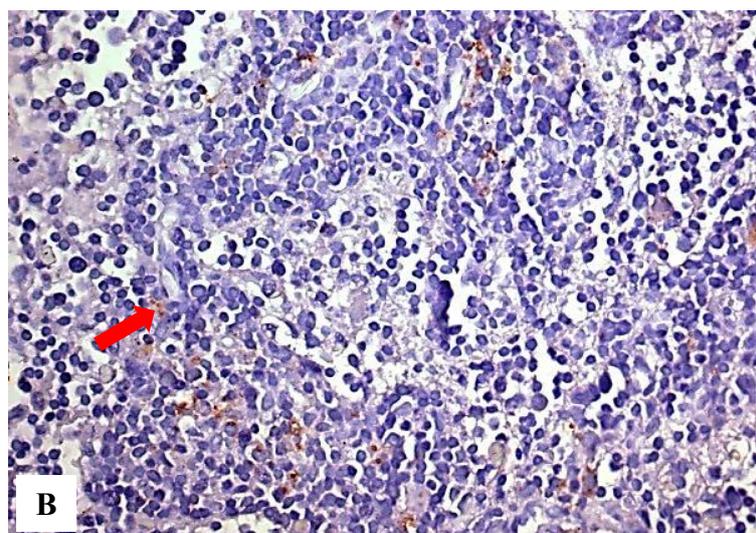
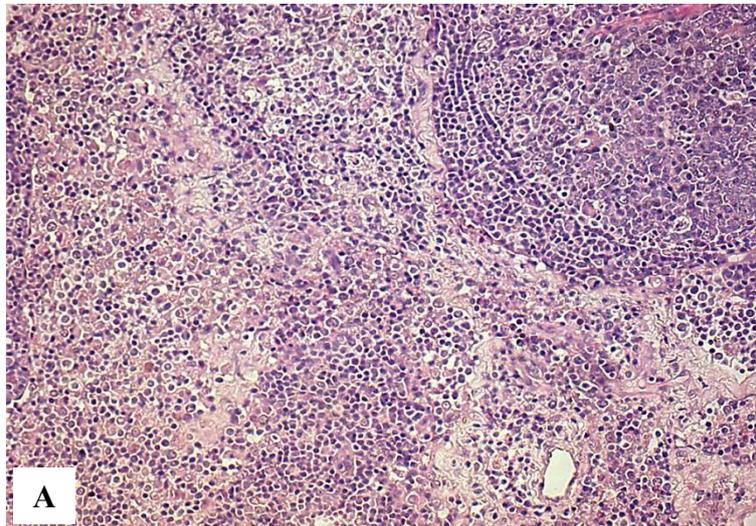
**Figura 14 -** Micrografia de baço de cão naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*: (A) região de polpa branca com ausência de centro germinativo e área T dependente (HE, objetiva de 20); (B) micrografia de baço, com amastigotas imunomarcadas (seta) (IHQ, objetiva de 40).

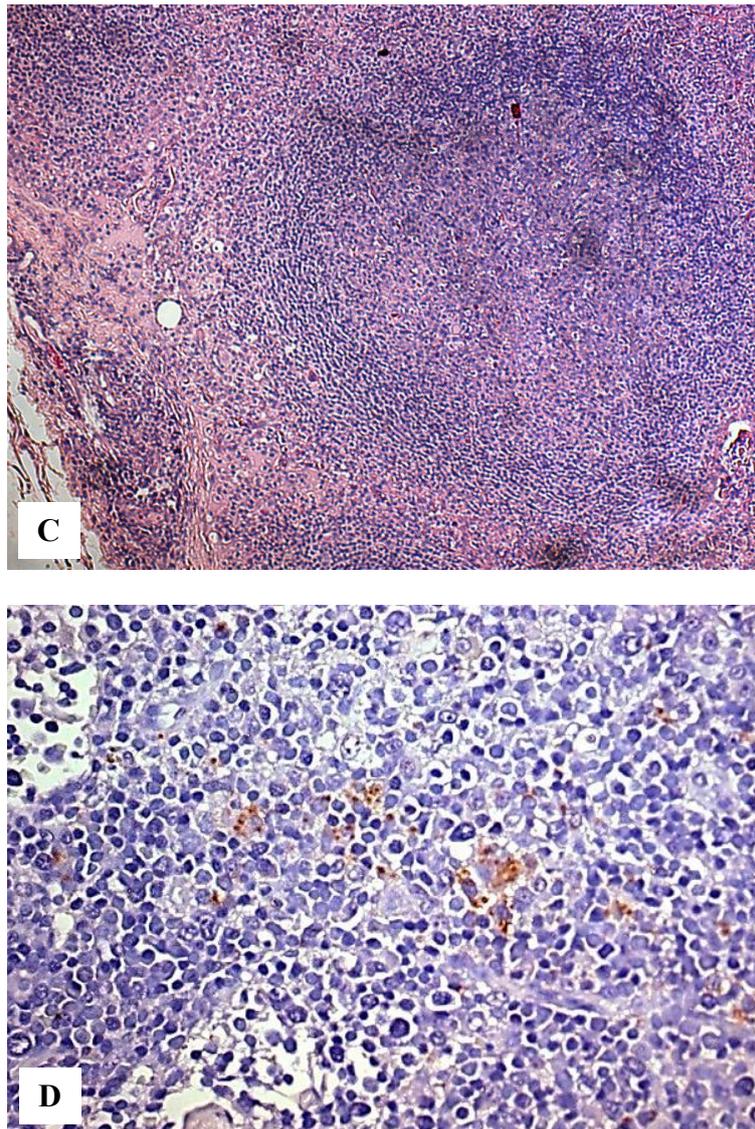
No fígado houve preservação da estrutura lobular, todavia a lesão fundamental foi hepatite crônica, variando de discreta a moderada, caracterizada pelo exsudato do tipo plasmioistiolinfocitário localizado nos espaços-porta e no parênquima (lóbulo hepáticos) caracterizado por granulomas intralobulares em 46% dos animais. Esses granulomas, de tamanho e número variados foram compostos por macrófagos parasitados ou não, na sua forma epitelióide (núcleos hipocorados e vesiculosos, cromatina frouxa e citoplasma amplo), pequeno número de linfócitos e plasmócitos (FIG. 15 A e B). Vasos sinusoidais congestionados foram observados, como também hipertrofia e hiperplasia das células de Kúpffer parasitadas com amastigotas em 34% dos animais. Foi verificada degeneração dos hepatócitos e inflamação portal em todos os animais infectados, sendo que variou entre discreta e moderada. Congestão e hemossiderose foram encontradas em 26% e 58% dos casos respectivamente, mas discreta em todos dos casos estudados.



**Figura 15 -** Micrografia de fígado de cão naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*. (A) fígado com inflamação perivascular (seta larga) e granuloma (seta fina) (HE, objetivo de 20); (B) micrografia de fígado, com amastigotas imunomarcadas (seta) (IHQ, objetiva de 40).

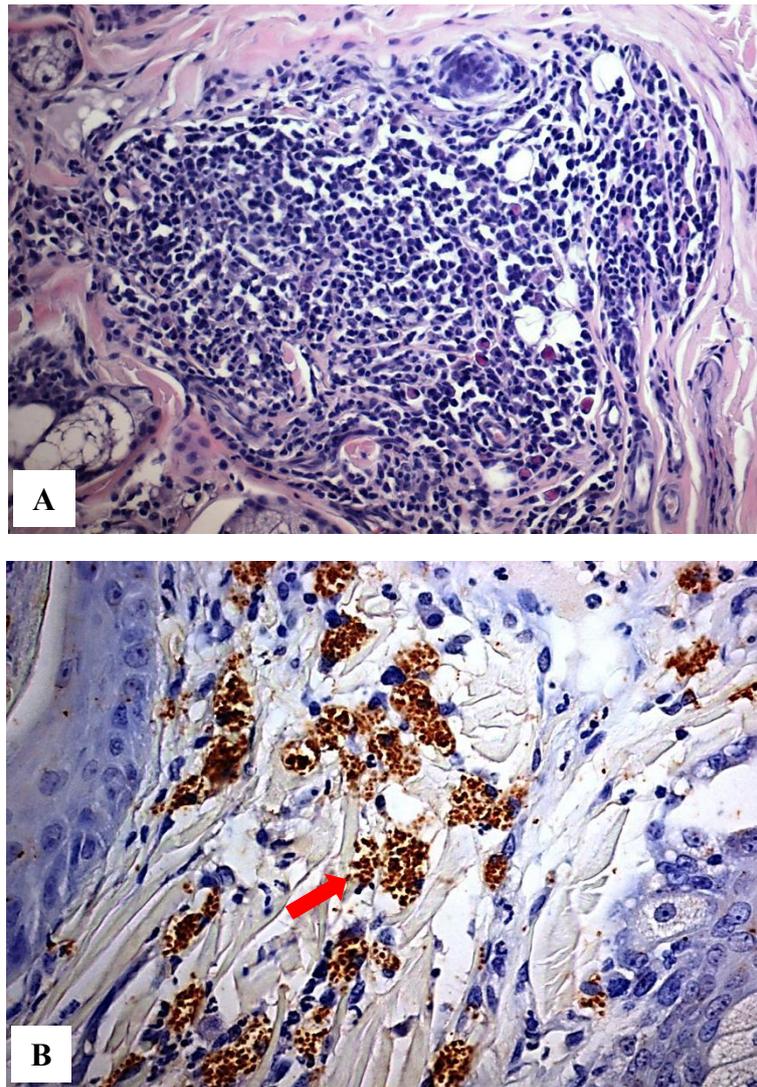
Nos linfonodos as lesões mais frequentes foram linfadenite capsular, hipertrofia das regiões cortical e medular, espessamento da cápsula, hipertrofia e hiperplasia das células dos cordões e seios medulares. Houve inflamação no seio subcapsular e na região medular (cordões e seios) com padrão predominantemente plasmocitofollicular em 83% dos casos. De fato, a hipertrofia e hiperplasia de cordões medulares foi a lesão fundamental caracterizada pela presença maciça de macrófagos, parasitados ou não, por vezes diferenciados em células epitelióides. Hemossiderose foi observada tanto nos linfonodos cervicais quanto nos mesentéricos. Além disso, observou-se infecção demonstrada pela presença de formas amastigotas em 14% dos linfonodos mesentéricos (FIG. 16 A e B) e em 25% dos cervicais (FIG. 16 C e D).





**Figura 16 -** Micrografia de linfonodo de cão naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*: (A) linfonodo mesentérico – note inflamação subcapsular e perda da arquitetura do órgão com áreas densamente celularizadas (HE, objetiva de 40); (B) linfonodo mesentérico com amastigotas imunomarcadas difusamente distribuídas (seta) (IHQ, objetiva de 40); (C) micrografia do linfonodo cervical com espessamento da cápsula (seta), congestão e perda da arquitetura; (D) linfonodo cervical com amastigotas imunomarcadas (seta) (IHQ, objetiva de 40).

Nos fragmentos de pele de orelha de todos os animais (FIG. 17 A) observaram-se áreas de inflamação crônica, focal e/ou difusa acometendo todas as camadas da derme. O exsudato era composto por células mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos) distribuído em torno dos vasos e glândulas. Observou-se também alterações da epiderme como acantose, hiperqueratose, pérolas córneas, paraceratose e degeneração hidrópica. Parasitos foram observados em 100% dos animais (FIG. 17 B).



**Figura 17 -** Micrografia de pele de orelha de cão naturalmente infectado com *L. infantum chagasi*: (A) região da derme com infiltrado inflamatório crônico, focal, densamente celularizado, composto por plasmócitos e macrófagos (HE, objetiva de 40); (B) micrografia de pele com amastigotas imunomarcadas difusamente distribuídas (seta) (IHQ, objetiva de 40).

No GRAF. 6 observamos a frequência da positividade nos órgãos dos cães avaliados. Entretanto, na Tabela 8 demonstramos os mesmos parâmetros, mas considerando a classificação clínica dos animais.

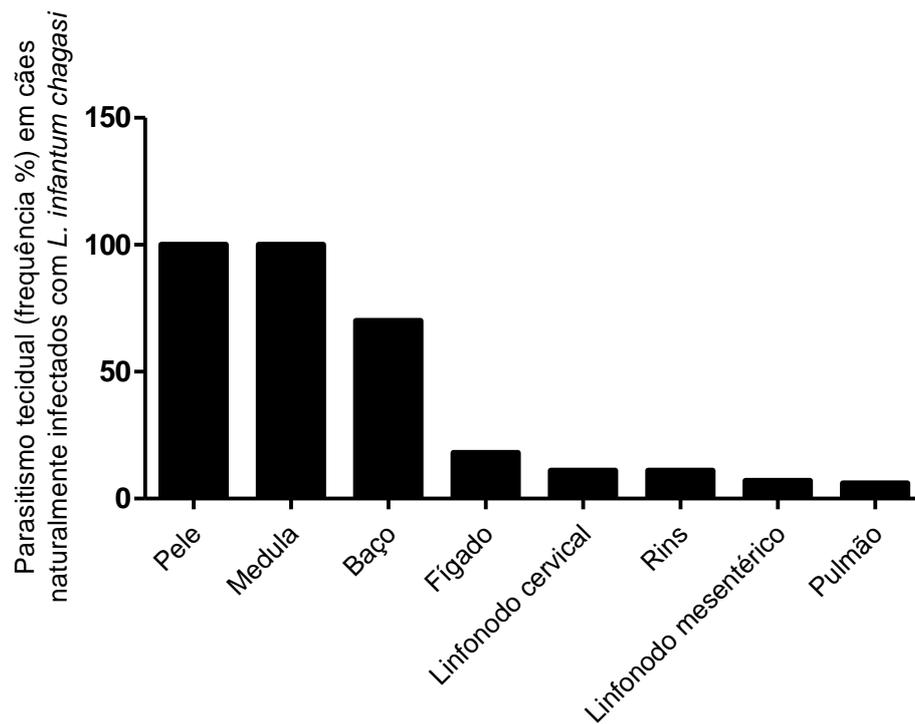


Gráfico 6 - Frequência da positividade tecidual, determinada por imuno-histoquímica, em cães provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG.

**TABELA 8 - Avaliação da carga parasitária nos órgãos de cães positivos para *L. infantum chagasi* provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG.**

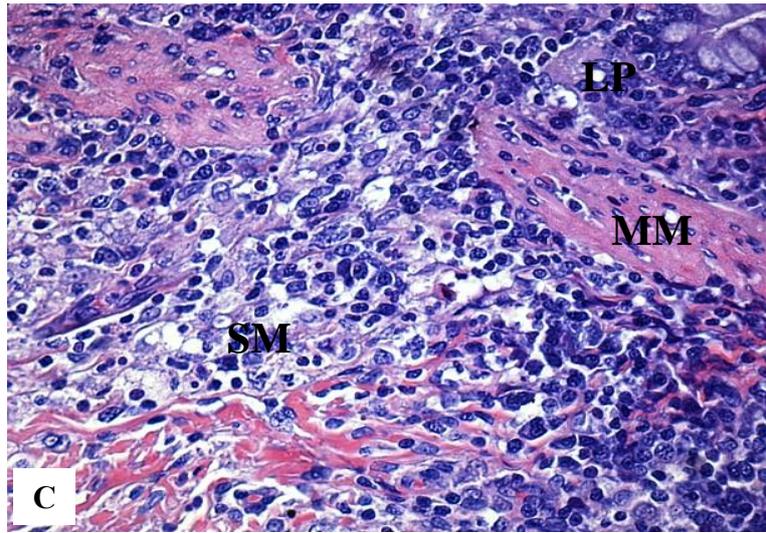
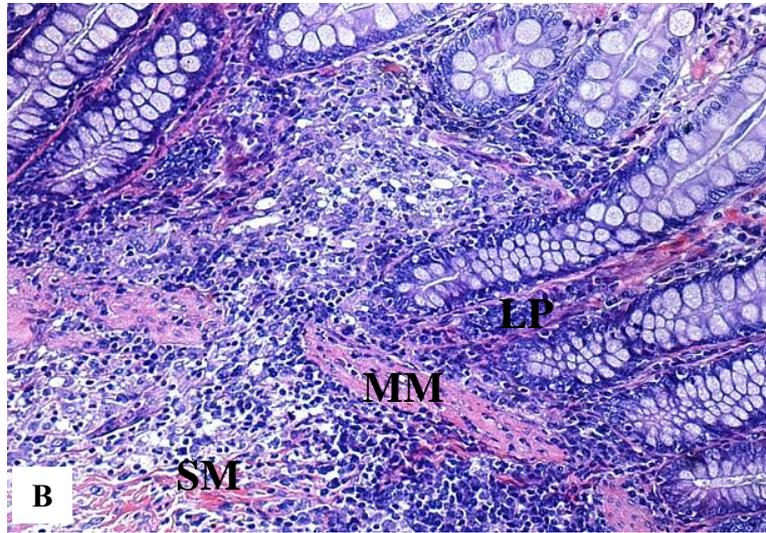
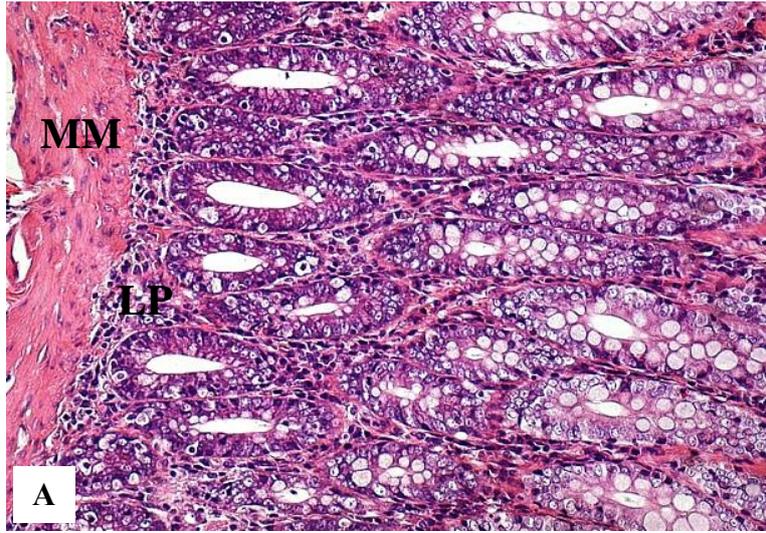
Carga parasitária	Percentagem n = 44	Percentagem Assintomáticos (n = 20)	Percentagem Sintomáticos (n = 24)
Baço	70%	30%	40%
Coração	0%	-	-
Fígado	34%	9%	25%
Linfonodo cervical	25%	4,5%	20,5%
Linfonodo mesentérico	14%	5%	9%
Medula	100%	23%	77%
Pele	100%	41%	59%
Pulmão	6%	-	6%
Rim	20%	-	20%

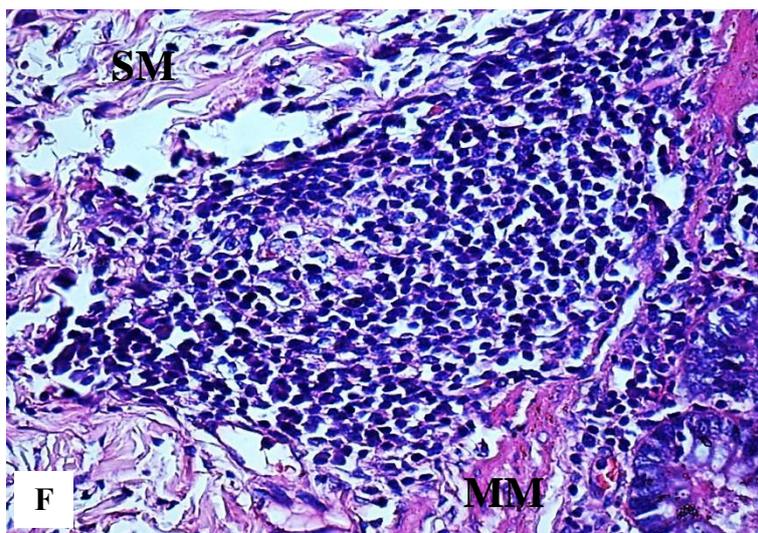
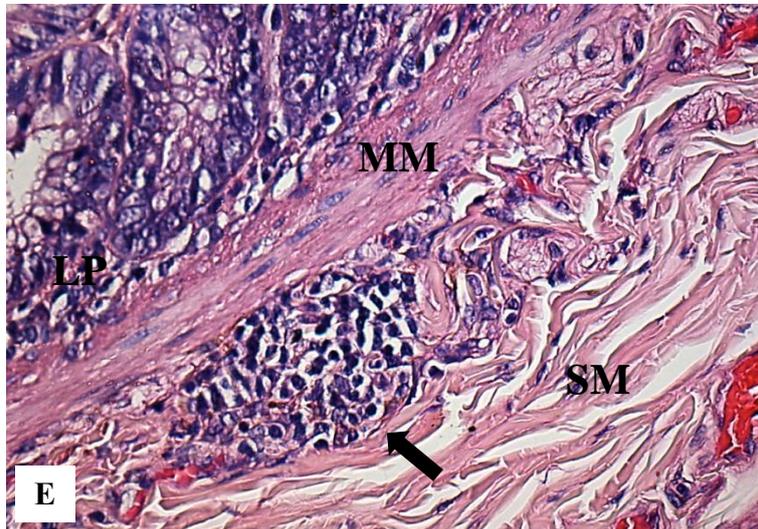
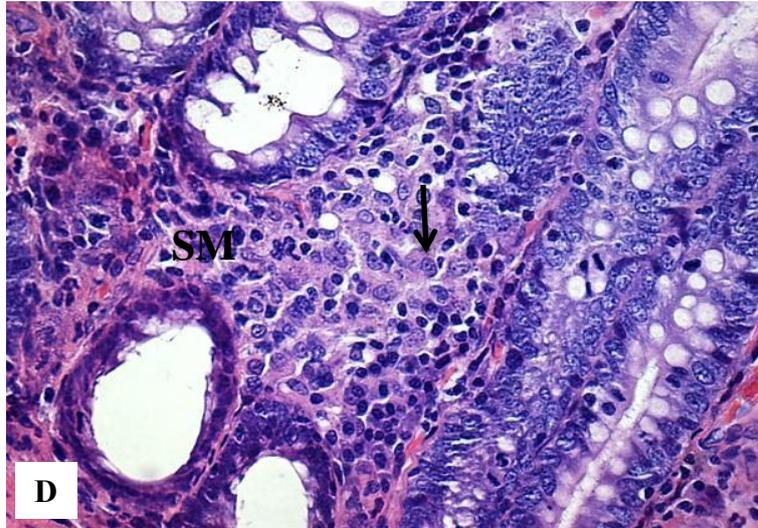
### 7.7.1 Trato gastrointestinal

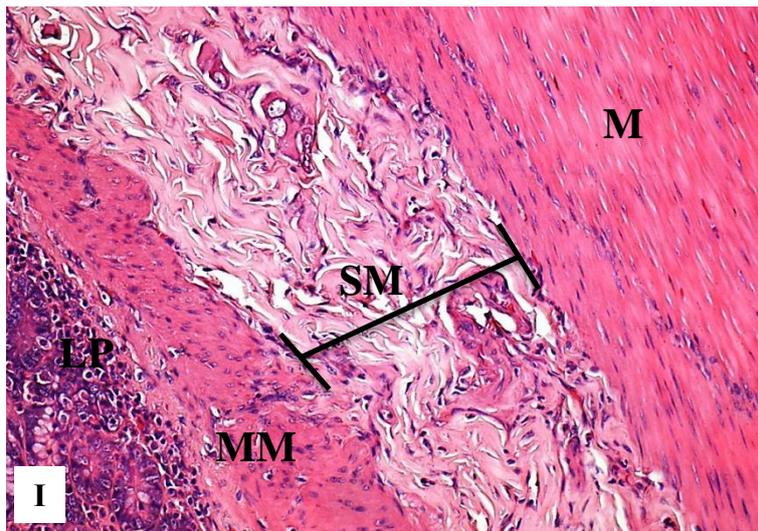
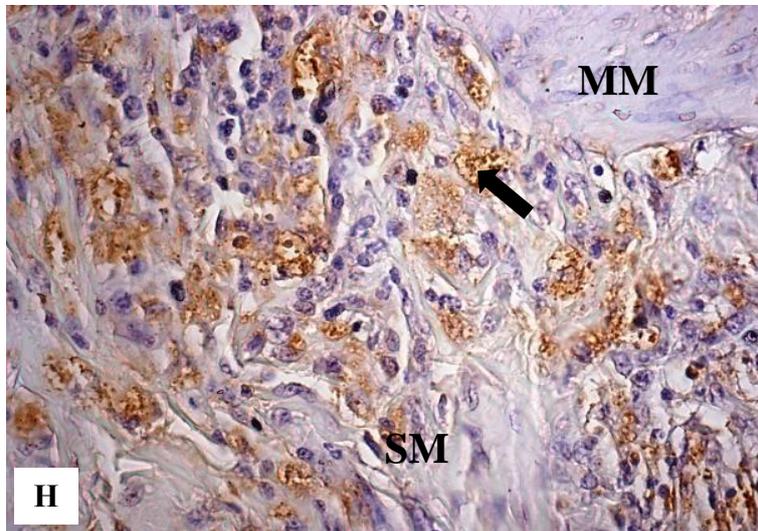
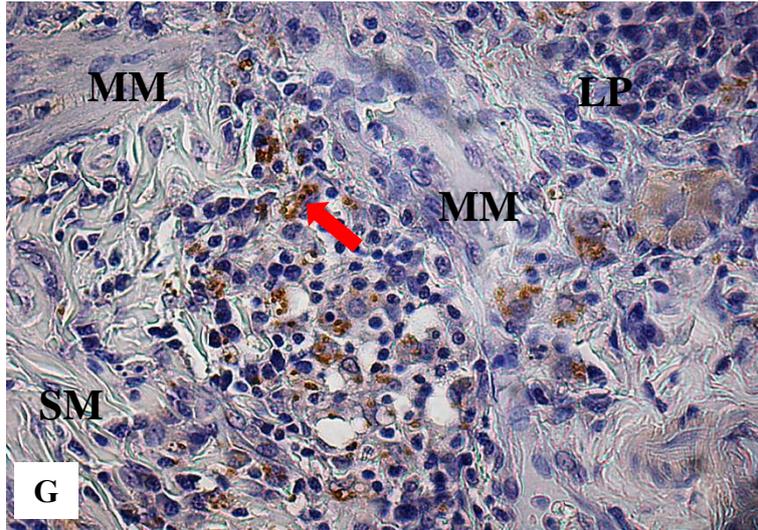
A análise histológica do TGI foi direcionada às camadas mucosa e submucosa dos seguintes segmentos: esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto. De modo geral, os cães infectados apresentaram aumento da celularidade na lâmina própria com exceção do esôfago, em comparação com os animais não infectados (FIG. 18 A e B). Havia predominância de células mononucleares como plasmócitos, macrófagos e linfócitos, com alguns neutrófilos e eosinófilos de permeio (FIG. 18 C). Não raro, os macrófagos apresentavam-se com morfologia peculiar de células epitelióides com núcleos de aspecto vesiculoso, cromatina frouxa e citoplasma amplo (FIG. 18 D). Em 96% dos casos, em pelo menos um dos segmentos, observou-se macrófagos epitelióides juntamente com outros macrófagos e linfócitos. Em alguns casos (12%) essas células formavam nódulos sugerindo formação de granulomas (FIG. 18 E e F). Formas amastigotas de *Leishmania* foram observadas por IHQ particularmente dentro de macrófagos na lâmina própria (forma epitelióide ou não) independente da forma clínica dos cães infectados (FIG. 18 G e H).

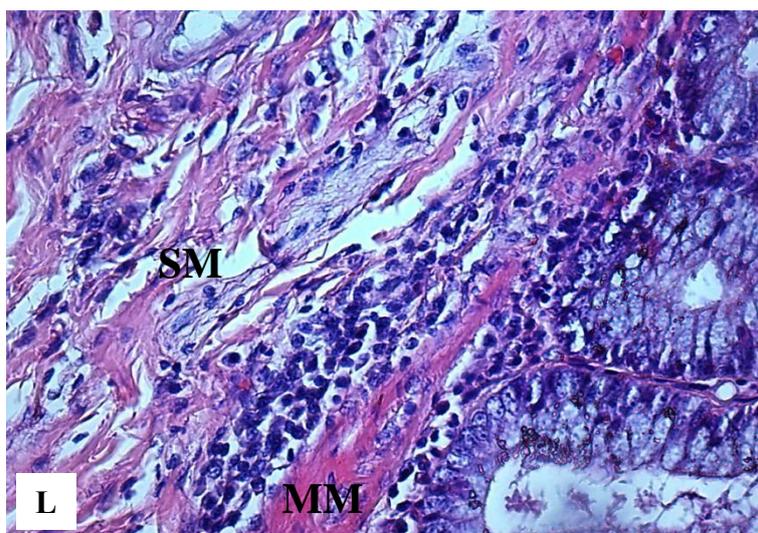
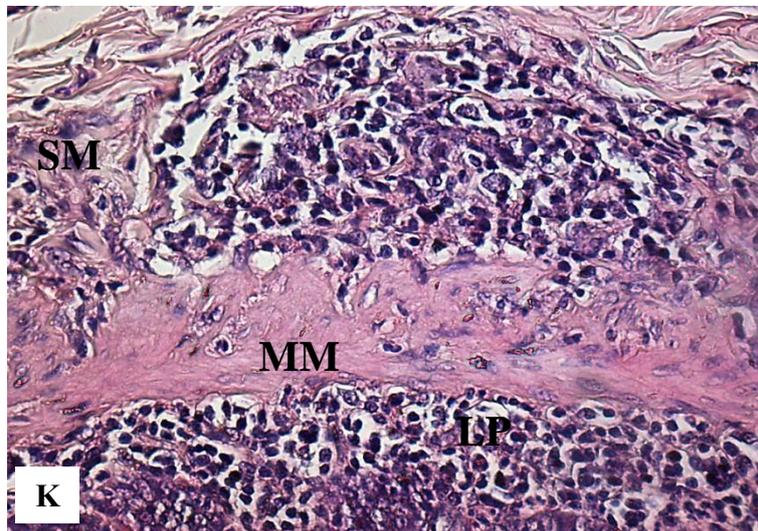
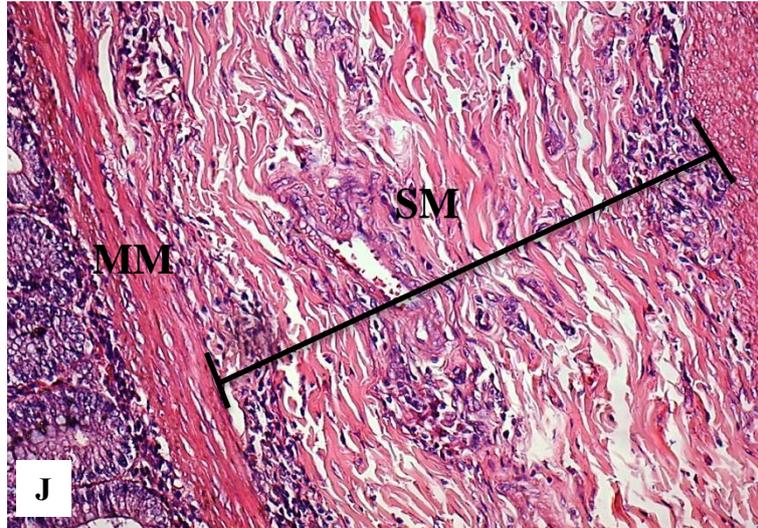
Na submucosa de todos os segmentos do TGI, exceto esôfago, observamos infiltrado inflamatório crônico (FIG. 18 I e J). O exsudato ora difuso ora focal se concentrava ao redor dos vasos e anexos (FIG. 18 K). Por vezes (39% dos casos) o exsudado era intenso promovendo descontinuidade da muscular da mucosa se coalescendo com as células da lâmina própria (FIG. 18 B e L).

Apesar do notável aumento da celularidade da lâmina própria e inflamação da submucosa de todos os segmentos do TGI (exceto esôfago), alterações regressivas como atrofia pôde ser observada nas porções finais, ceco e cólon. Entretanto em nenhum dos casos encontramos indícios de lesão tecidual na camada mucosa principalmente com formação de úlceras. Outras alterações inflamatórias nas quais o exsudato forma arranjos especiais como abscessos ou granulomas piogênicos não foram observados. Atrofia do epitélio foi a única alteração encontrada da camada epitelial em alguns casos (8%).



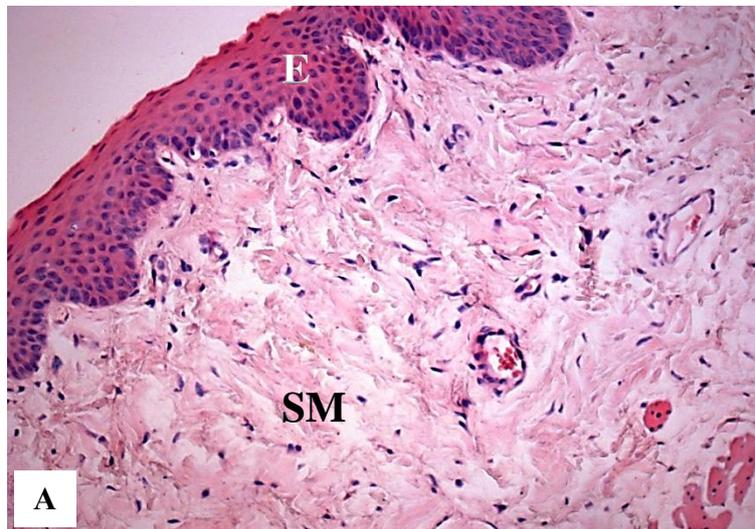


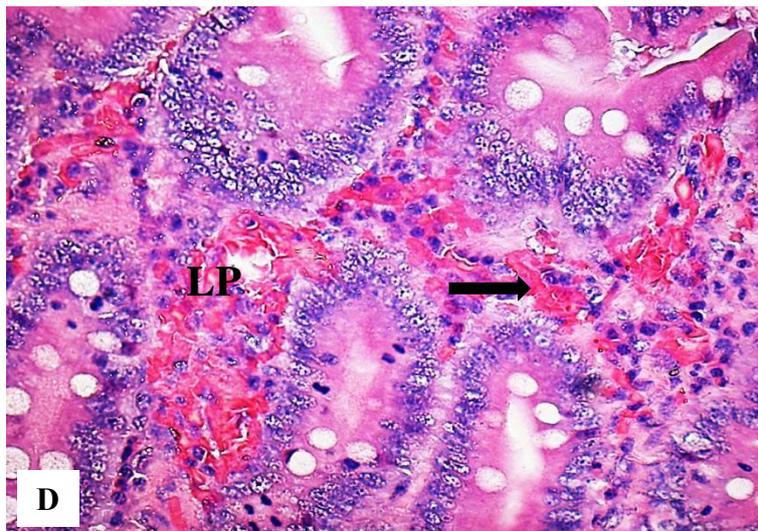
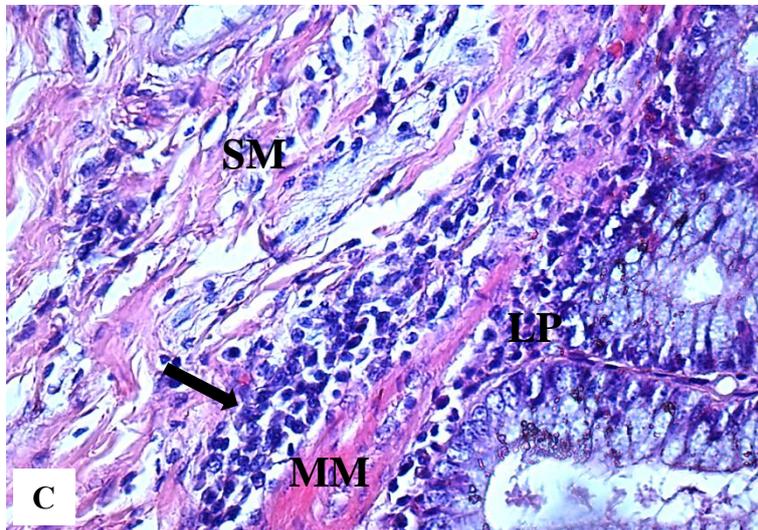
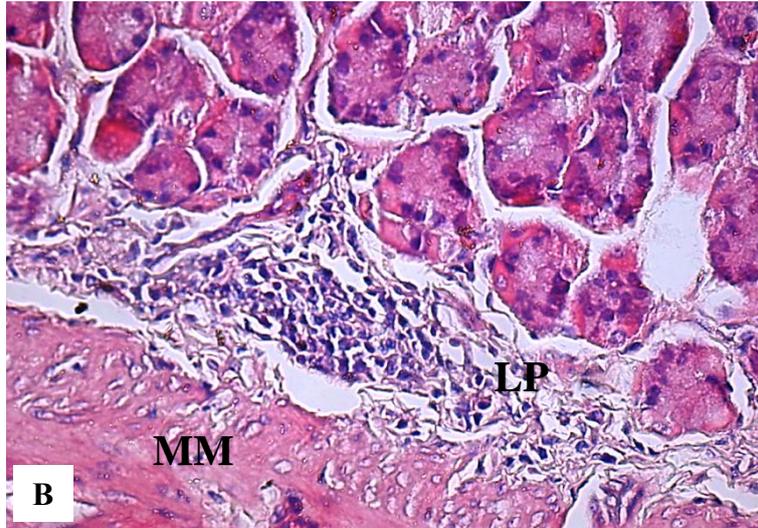


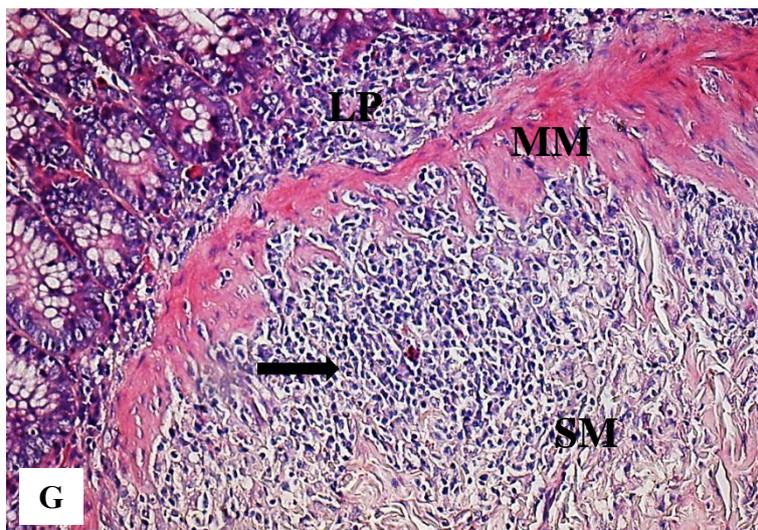
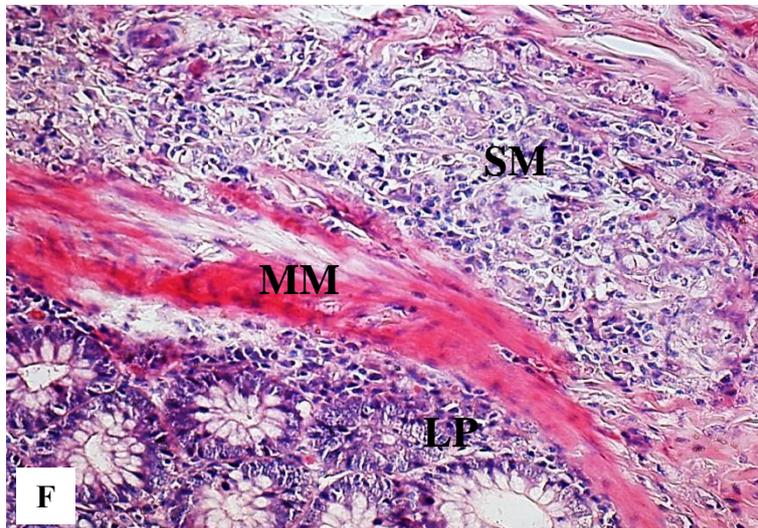
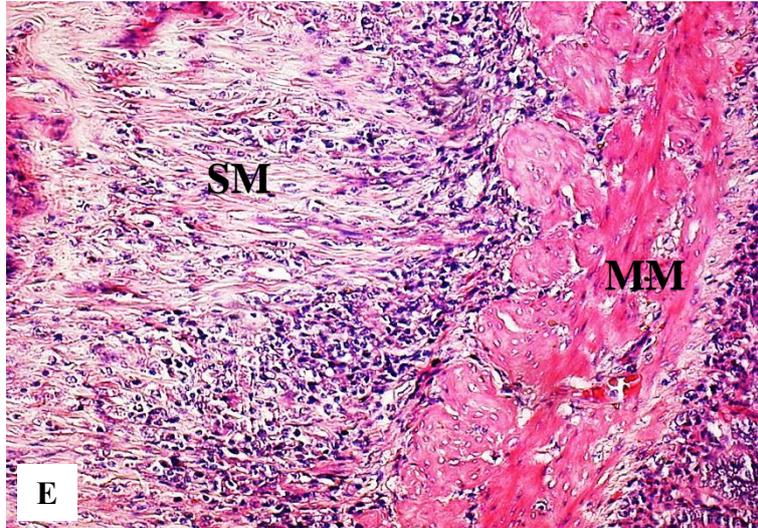


**Figura 18 - Micrografia de segmentos intestinais de cães controle e naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*. (A) cólon de cão controle demonstrando mucosa (lâmina própria) e muscular da mucosa (HE, objetiva de 20); (B) exsudato celular no ceco (aumento da celularidade na lâmina própria - camada mucosa) (HE, objetiva de 20); (C) predominância de células mononucleares como plasmócitos, macrófagos e linfócitos, com alguns polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos de permeio (HE, objetiva de 40); (D) macrófagos (seta) apresentavam-se com morfologia peculiar de células epitelióides com núcleos de aspecto vesiculoso, cromatina frouxa e citoplasma amplo (HE, objetiva de 40); (E e F) macrófagos epitelióides juntamente com outros macrófagos e linfócitos formavam nódulos sugerindo formação de granulomas (seta) (HE, objetiva de 40); (G e H) formas amastigotas de *Leishmania* (seta) particularmente dentro de macrófagos na lâmina própria (Estreptoavidina-peroxidase, objetiva de 40); (I) submucosa de cão controle - note a espessura da lâmina própria no controle (┌─┐) (J) infiltrado inflamatório crônico na submucosa - note a espessura da lâmina própria no cão infectado (┌─┐) (HE, objetiva de 20); (K) exsudato predominantemente plasmohistolinfocitário focal na submucosa e lâmina própria (HE, objetiva de 40); (L) descontinuidade da muscular da mucosa (HE, objetiva de 40); LP: lâmina própria; MM: muscular da mucosa; SB: submucosa; M: muscular.**

De forma específica, o esôfago não apresentou nenhuma alteração (FIG. 19 A); o estômago apresentou focos inflamatórios na base da mucosa e congestão vascular (FIG. 19 B); no duodeno observou-se congestão vascular, inflamação difusa na lâmina própria e plasmocitose (FIG. 19 C); no jejuno foi visto apenas congestão (FIG. 19 D); o íleo apresentou inflamação focal e difusa, congestão e plasmocitose (FIG. 19 E); no ceco identificou-se inflamação difusa (FIG. 19 F); o cólon apresentou inflamação intensa, congestão e inflamação na submucosa (FIG. 19 G) e por fim no reto observou-se plasmocitose, congestão e inflamação difusa (FIG. 19 H).







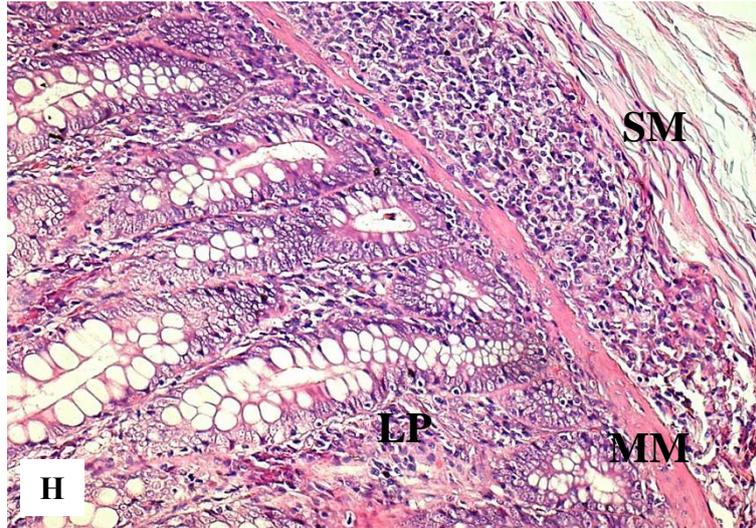


Figura 19 - Micrografia de segmentos intestinais de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) esôfago sem alterações (HE, objetiva de 20); (B) estômago com focos inflamatórios na base da lâmina própria e congestão vascular (HE, objetiva de 20); (C) duodeno com congestão vascular, inflamação difusa na lâmina própria e plasmocitose (seta) (HE, objetiva de 40); (D) jejuno apresentando congestão (HE, objetiva de 40); (E) íleo com inflamação focal e difusa, congestão e plasmocitose (HE, objetiva de 20); (F) ceco com inflamação difusa (HE, objetiva de 20); (G) cólon com inflamação intensa, congestão e inflamação na submucosa (seta) (HE, objetiva de 20); (H) reto com plasmocitose, congestão e inflamação difusa (HE, objetiva de 20); LP: lâmina própria; MM: muscular da mucosa; SB: submucosa.

### 7.8 Avaliação quantitativa (morfométrica) das células inflamatórias

Observou-se aumento da celularidade em todos os segmentos intestinais (exceto no esôfago) dos animais infectados em comparação ao grupo controle ( $p = 0,005$ ), porém somente na região do ceco houve diferença estatística entre o grupo sintomático em relação ao grupo assintomático ( $p = 0,0040$ ). Entre os segmentos jejuno e cólon, não se observou diferença entre o número de células inflamatórias (GRAF. 7).

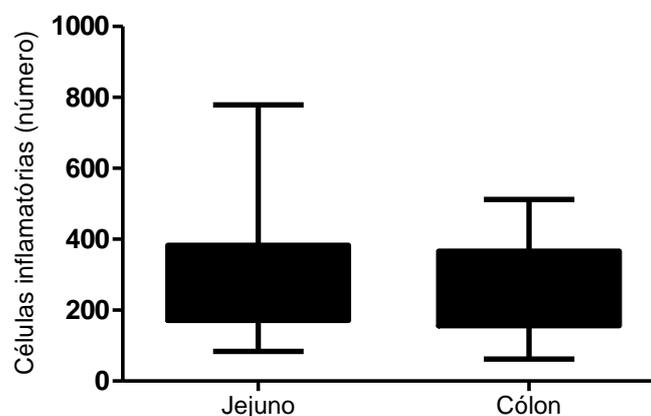


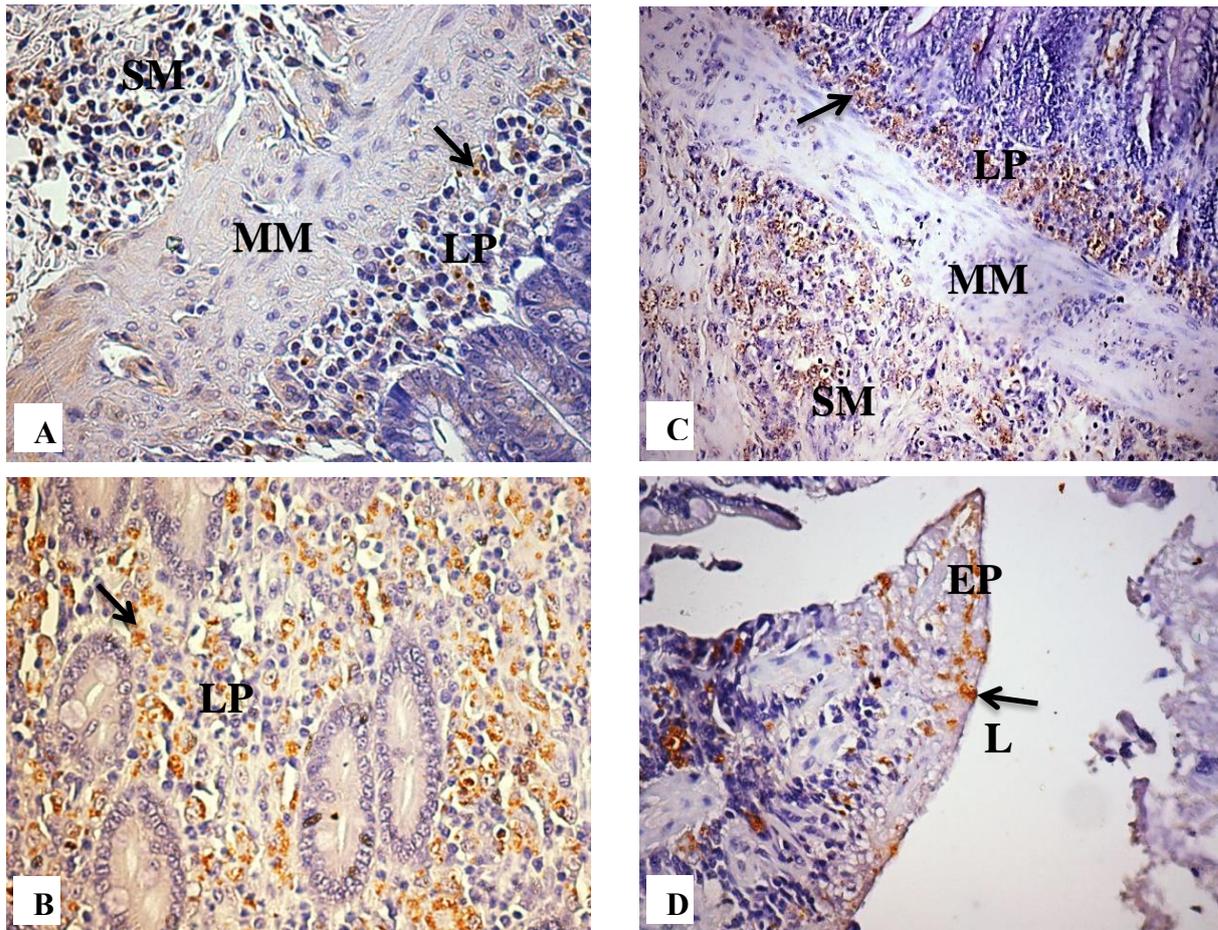
Gráfico 7 - Quantidade de células inflamatórias no jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*.

### 7.9 Avaliação qualitativa da carga parasitária

Observou-se nessa avaliação que as regiões de marcação positiva apresentaram formas amastigotas facilmente localizáveis nos segmentos da lâmina própria e submucosa do TGI (FIG. 20 A). Na avaliação qualitativa dos grupos infectados, 83% apresentaram carga parasitária pela marcação imuno-histoquímica sendo que em 70% os parasitos foram encontrados em maior proporção no intestino grosso (ceco e cólon) sendo essas as regiões que mais normalmente se encontram macrófagos parasitados, como representado na Tabela 9. Em 40% dos animais foram encontradas *Leishmanias* no intestino delgado - duodeno ou íleo (FIG. 20 B) e apenas um animal teve marcação no jejuno e estômago. No intestino grosso, 88% dos parasitos foram visualizados subjacentes à muscular da mucosa, na base da lâmina própria (FIG. 20 C). Por sua vez, no estômago, duodeno e íleo as amastigotas foram encontradas, em maior proporção, próximas ao lúmen intestinal, nas vilosidades, logo abaixo do epitélio (FIG. 20 D).

**TABELA 9 - Avaliação da carga parasitária no TGI de cães positivos para *L. infantum chagasi* provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG.**

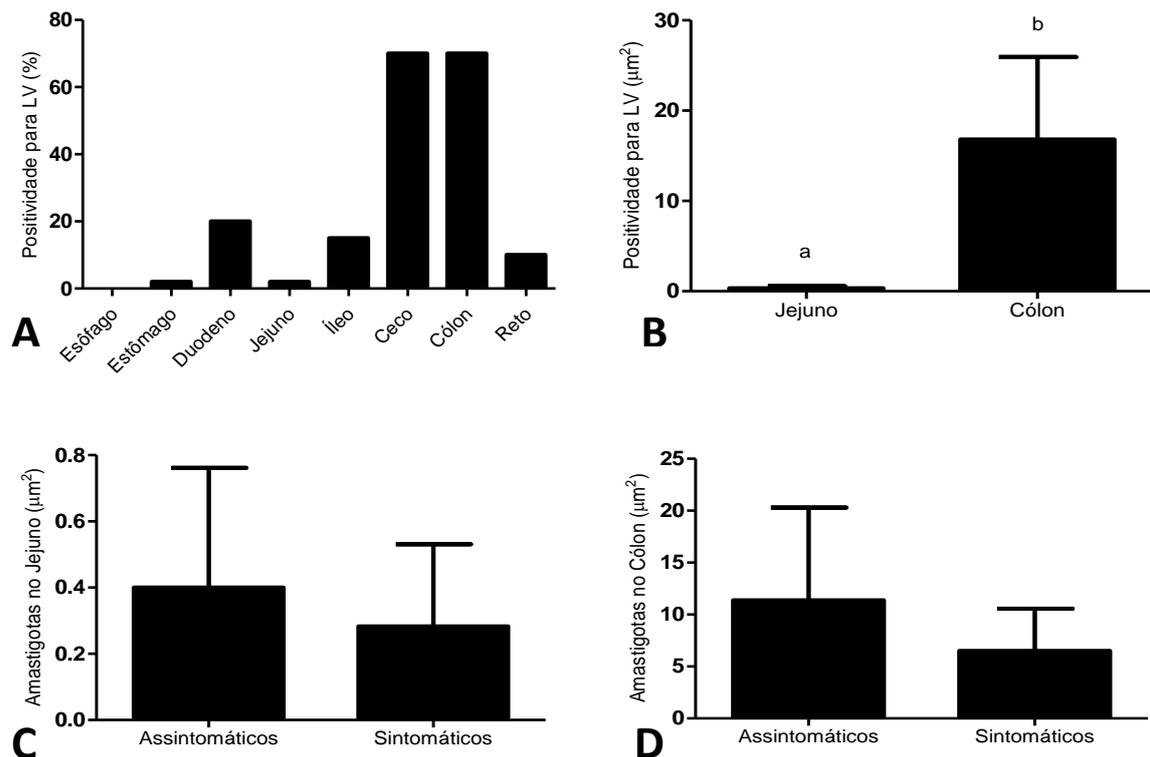
Segmentos	Percentagem n = 44	Percentagem Assintomáticos (n = 20)	Percentagem Sintomáticos (n = 24)
Esôfago	0%	-	-
Estômago	2%	2%	-
Duodeno	20%	8%	12%
Jejuno	2%	2%	-
Íleo	15%	-	15%
Ceco	70 %	32%	38%
Cólon	70 %	30%	40%
Reto	10%	4%	6%



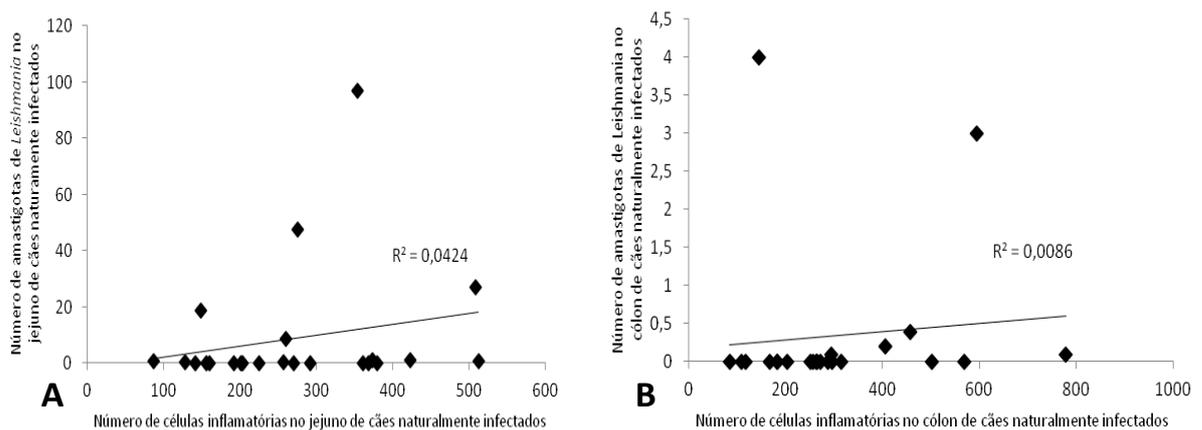
**Figura 20 -** Micrografias de segmentos intestinais: (A) amastigotas nos segmentos da lâmina própria e submucosa do cólon (objetiva de 40); (B) *Leishmanias* na lâmina própria no duodeno (objetiva de 40); (C) parasitos subjacentes à muscular da mucosa, na base da lâmina própria no ceco (objetiva de 40); (D) *Leishmanias* na lâmina própria, entre as vilosidades, logo abaixo do epitélio intestinal no duodeno (objetiva de 40) Estreptoavidina-peroxidase; LP: lâmina própria; MM: muscular da mucosa; SB: submucosa; EP: epitélio da mucosa; S: lúmen; setas apontando para as amastigotas coradas em âmbar.

### 7.10 Avaliação quantitativa (morfométrica) da carga parasitária

Os segmentos do TGI mais frequentemente parasitados (70%) e também com maior número de parasitos foram os do intestino grosso em relação aos outros segmentos ( $p = 0,005$ ) como já demonstrado na Tabela 9 e (GRAF. 8 A). Entre jejuno e cólon verificamos diferença ( $p = 0,0017$ ) onde cólon alberga mais parasitos que jejuno (GRAF. 8 B). Entre assintomáticos e sintomáticos não há diferença tanto na frequência quanto na quantidade de parasitos (GRAF. 8 C e D). A correlação entre inflamação - aumento da celularidade e carga parasitária foi positiva no jejuno ( $r^2 = 0,424$ ) e cólon ( $r^2 = 0,0086$ ) (GRAF. 9 A e B).



**Gráfico 8 - Média do número de amastigotas de *Leishmania* em 20 campos, de 44 animais provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) frequência da positividade dos segmentos intestinais (B) comparação entre os segmentos intestinais: jejuno e cólon,  $p = 0,0280$ ; (C) comparação entre jejuno de cães assintomáticos e sintomáticos  $p = 0,6042$ ; (D) comparação entre cólon de cães assintomáticos e sintomáticos  $p = 0,3280$ ; (letras diferentes equivalem a diferença estatística).**



**Gráfico 9 - Correlação entre número de amastigotas de *Leishmania* e número de células inflamatórias em 44 animais provenientes do Município de Ribeirão das Neves-MG: (A) jejuno ( $r^2 = 0,0424$ ); (B) cólon ( $r^2 = 0,0086$ ).**

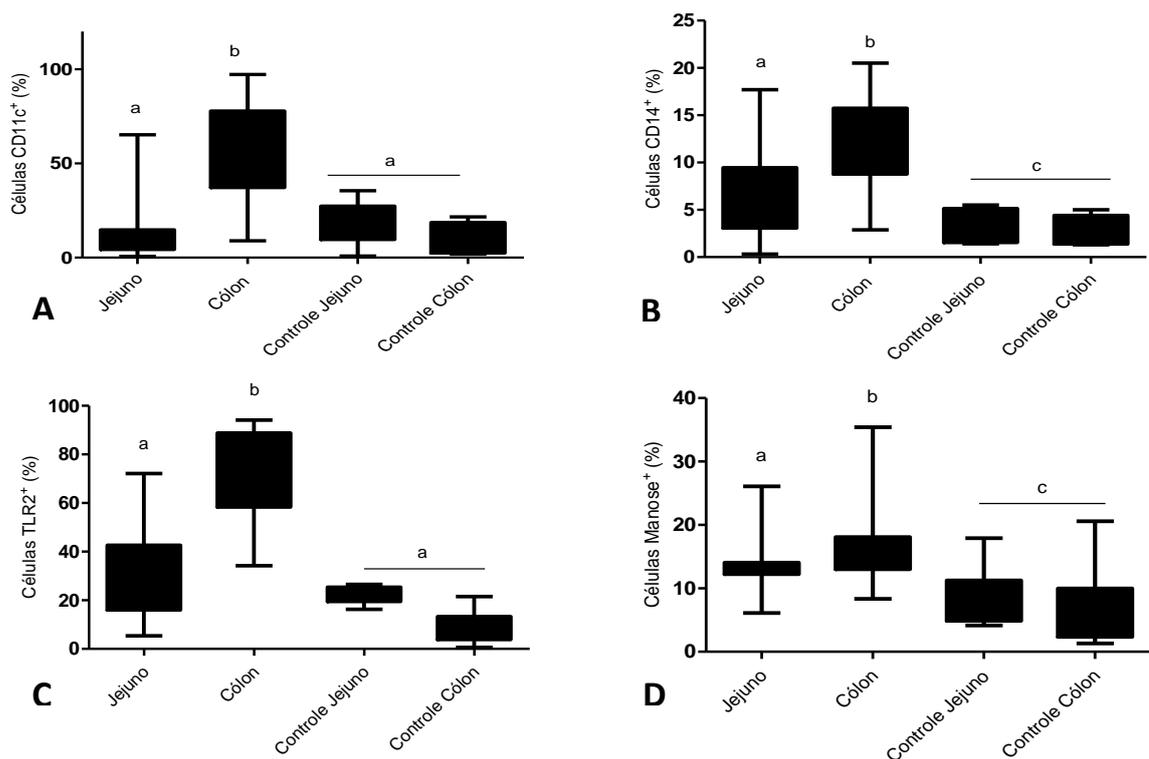
Tendo em vista a frequência com que nosso grupo observa o mesmo padrão de infecção no TGI de cães com LV, além do acometimento diferencial nos diversos segmentos, optamos por avaliar alguns aspectos imunológicos tão somente nas porções jejuno e cólon. Essa escolha se baseia no fato do cólon ser o segmento intestinal mais frequentemente parasitado e o jejuno, o menos parasitado. Justifica-se também a escolha de apenas dois segmentos pelo fato da técnica de citometria de células da LP de cão ser por demais laboriosa, optamos, portanto, por fazer a frequência e a intensidade média de fluorescência de alguns receptores, envolvidos com a infecção por *Leishmania*, em apenas dois segmentos intestinais. Os linfonodos cervicais e mesentéricos foram incluídos na análise com o intuito de se observar em qual deles alguns receptores estão mais ou menos expressados, visto que os linfonodos mesentéricos são fonte de várias células drenadas do e para o intestino, em comparação ao um linfonodo, como o cervical, que está anatomicamente distante do TGI.

### **7.11 Citometria**

Para avaliação dos aspectos imuno-fenotípicos das células da lâmina própria e células dos linfonodos cervicais e mesentéricos foram adotadas duas estratégias: frequência e intensidade média de fluorescência dos receptores. A primeira avaliou a frequência de positividade do receptor de interesse, ou seja, o valor percentual das células expressando um determinado receptor fenotípico na população celular de interesse, ao passo que, a segunda estratégia avaliou a intensidade média de fluorescência, ou seja, a densidade de expressão de um determinado receptor fenotípico na população celular de interesse de forma constitutiva. A primeira abordagem possibilitou a quantificação de fenótipos celulares que apresentaram distribuição bimodal, ou seja, fenótipos positivos ou negativos para determinado receptor referente a uma população. Na segunda abordagem, foi utilizada análise semi-quantitativa da expressão de receptores fenotípicos que possuíam distribuição unimodal, ou seja, verificou-se em toda a população celular de interesse a expressão do referido receptor fenotípico. Nesse último tipo de avaliação, o deslocamento da população celular ao longo do eixo da IMF caracteriza alterações na densidade de expressão do referido receptor. As análises fenotípicas das células da lâmina própria e dos linfonodos foram realizadas a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos em gráficos de distribuição pontual de SSC versus FSC.

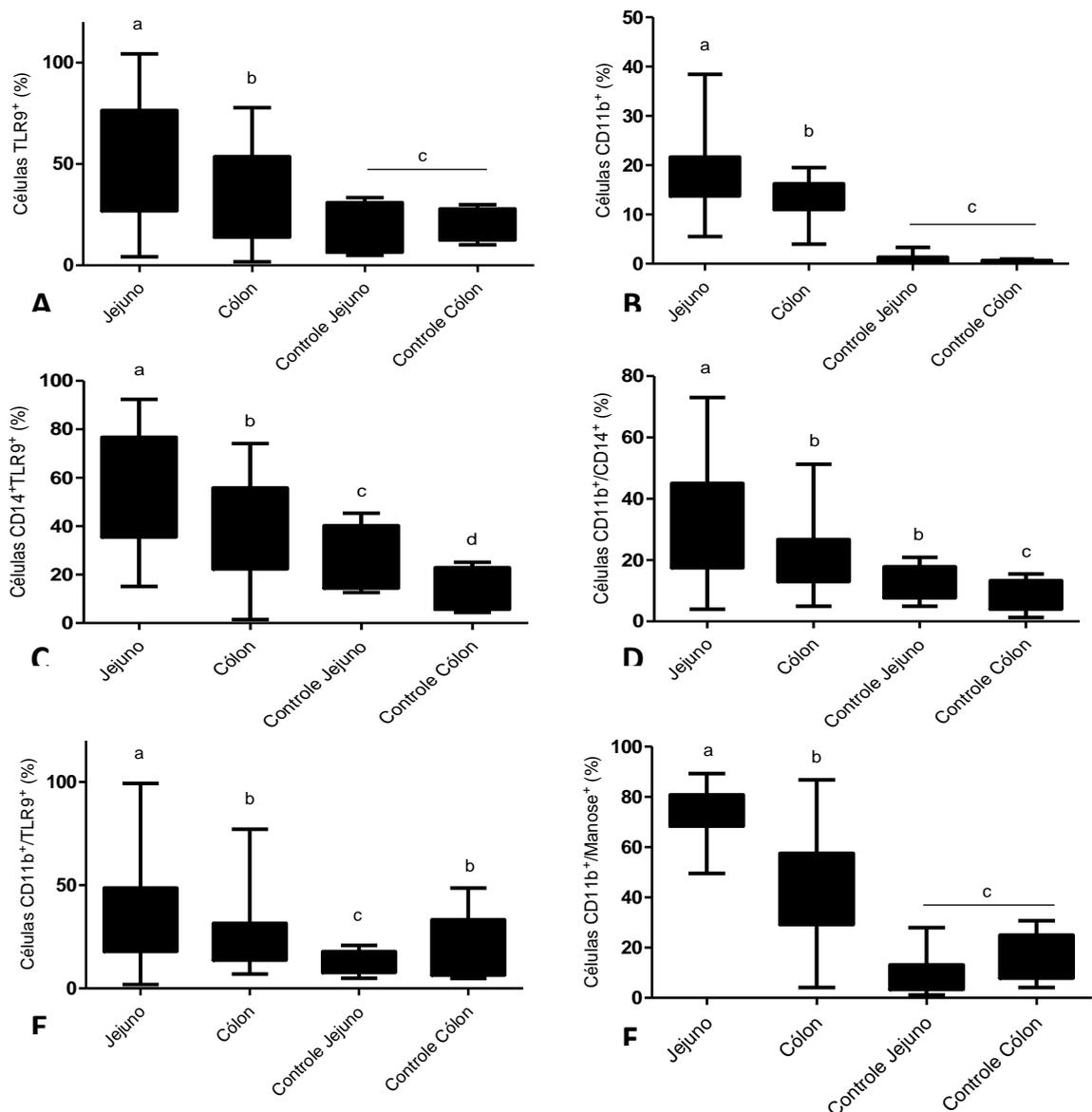
A partir da seleção da população de mononucleares da lâmina própria (Gráfico 10 A - D), foram avaliadas as subpopulações celulares expressando os receptores CD11b, CD11c,

CD14, TLR2, TLR9, Manose e CD11b<sup>+</sup> expressando CD14, Manose e TLR9. A partir da seleção da população de linfócitos, foi avaliada a expressão dos receptores CD4, CD4/FOXP3, CD8, CD8 expressando FOXP3, TLR2 e TLR9. Observamos que alguns receptores, tal como CD11c e TLR2, foram expressados com mais frequência no cólon em relação ao jejuno, mas não em relação ao seu controle ( $p = 0,0100$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente). Por sua vez, CD14 é expressado com mais frequência no cólon em relação ao jejuno ( $p = 0,0006$ ) e ao seu controle ( $p = 0,0001$ ) e igualmente Manose ( $p = 0,0444$  e  $0,0017$ , respectivamente) (GRAF. 10 A – D). Portanto, a infecção estimulou expressão de CD11c e TLR2 somente no cólon pois no jejuno o animal infectado se comporta igualmente ao animal controle em relação a esses dois receptores (GRAF. 10 A e C). Ao passo que os receptores CD14 e Manose foram mais expressados em animais infectados que nos não infectados, tanto no jejuno quanto no cólon (GRAF. 10 B e D). Por conseguinte animais não infectados expressam igualmente CD11c, CD14, TLR2 e Manose.



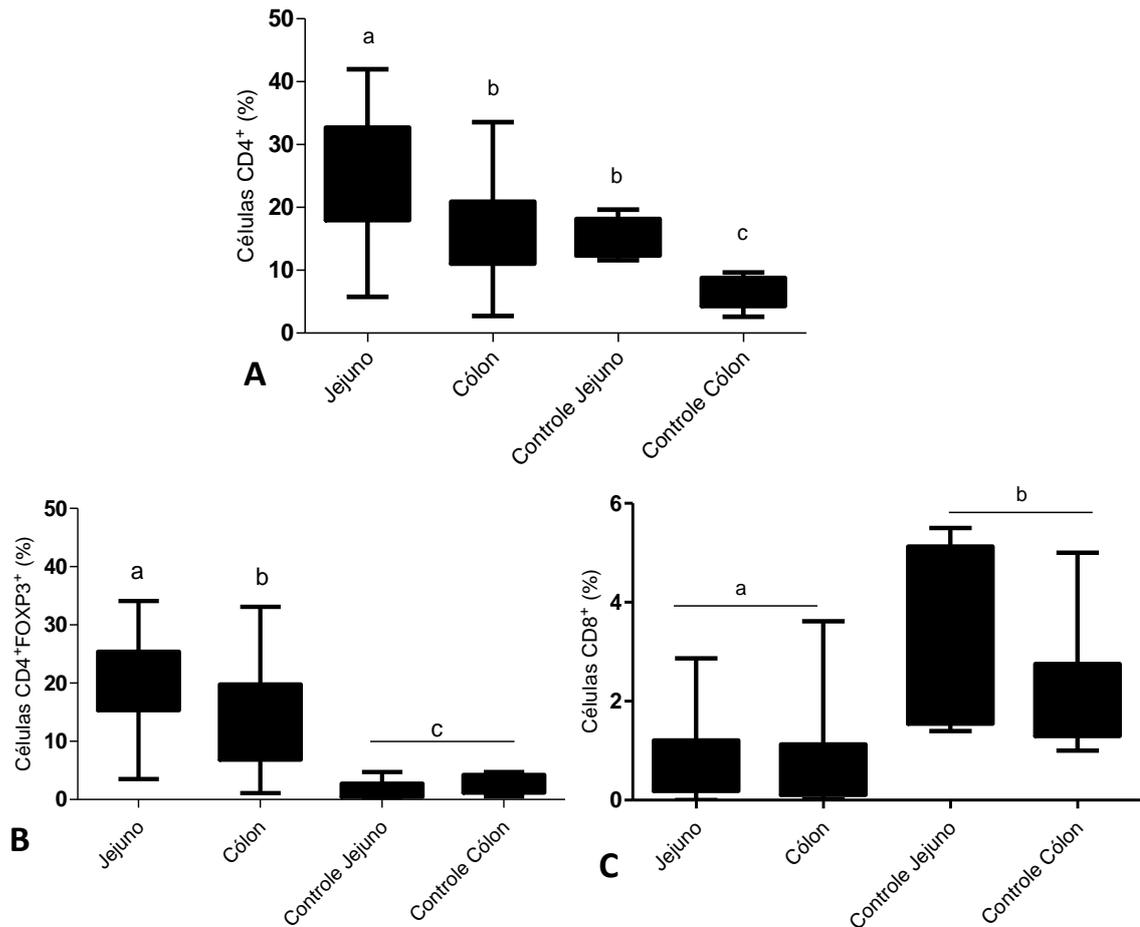
**Gráfico 10 - Porcentagem de receptores em células da lâmina própria de jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) CD11c<sup>+</sup> ( $p = 0,0100$  entre jejuno e cólon) (B) CD14<sup>+</sup> ( $p = 0,0006$  entre jejuno e cólon e  $p = 0,0001$  em relação ao controle); (C) TLR2<sup>+</sup> ( $p = 0,0001$ ) e (D) Manose<sup>+</sup> ( $p = 0,0444$  entre jejuno e cólon e  $p = 0,0017$  em relação ao controle); (letras diferentes equivalem a diferença estatística).**

Comparando a frequência dos receptores entre os segmentos intestinais, vimos que TLR9 foi mais frequente no jejuno em relação ao cólon e ao seu controle ( $p = 0,0476$  e  $p = 0,0027$ , respectivamente); como também CD11b ( $p = 0,0043$  e  $p = 0,0001$ , respectivamente); CD14 expressando TLR9 ( $p = 0,0026$  e  $p = 0,0002$ , respectivamente); CD11b expressando CD14 ( $p = 0,0042$  e  $p = 0,0007$ , respectivamente); CD11b expressando TLR9 ( $p = 0,0101$  e  $p = 0,0126$ , respectivamente) e CD11b expressando Manose ( $p = 0,0001$ ) (GRAF. 11 A - F). O animal infectado apresenta significativo aumento de TLR9, CD11b e a marcação duplamente positiva CD14/TLR9; CD14/CD11b e CD11b/Manose (GRAF. 11 A, B, C, D e F).



**Gráfico 11 - Porcentagem de receptores em células da lâmina própria de jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) TLR9<sup>+</sup> ( $p = 0,0476$  entre jejuno e cólon e  $p = 0,0027$  em relação ao controle); (B) CD11b<sup>+</sup> ( $p = 0,0043$  entre jejuno e cólon e  $p = 0,0001$  em relação ao controle); (C) CD14<sup>+</sup>/TLR9<sup>+</sup> ( $p = 0,0026$  entre jejuno e cólon e  $p = 0,0002$  em relação ao controle); (D) CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> ( $p = 0,0042$  entre jejuno e cólon e  $p = 0,0007$  em relação ao controle); (E) TLR9<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> ( $p = 0,0101$  entre jejuno e cólon e  $p = 0,0126$  em relação ao controle); (F) Manose<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> ( $p = 0,0001$ ).**

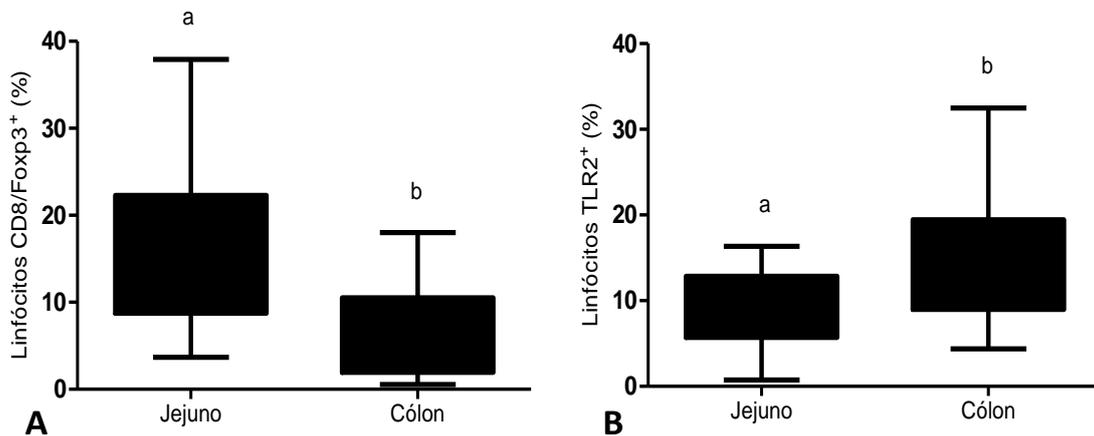
Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> apresentaram-se mais frequentes no jejuno em relação ao cólon ( $p = 0,0048$  e  $p = 0,0003$ , respectivamente). A frequência de CD8 não se diferenciou entre jejuno e cólon, mas sim entre jejuno/cólon e seus controles com  $p = 0,0006$  (GRAF. A- C). Contudo o animal infectado apresenta aumento de CD4 e Foxp3 ( $p = 0,0067$  e  $p = 0,0075$ , respectivamente) e redução de CD8 ( $p = 0,0006$ ).



**Gráfico 12 - Porcentagem de receptores em linfócitos da lâmina própria de jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) CD4<sup>+</sup> ( $p = 0,0048$  entre jejuno e cólon e  $p = 0,0067$  em relação ao controle); (B) CD4<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> ( $p = 0,0003$  entre jejuno e cólon e  $p = 0,0075$  em relação ao controle); (C) CD8<sup>+</sup> ( $p = 0,0006$  entre jejuno/cólon e controle); (letras diferentes equivalem a diferença estatística).**

A expressão de Foxp3<sup>+</sup> foi também avaliada em células T CD8<sup>+</sup> apresentando-se baixa, não obstante diferente entre jejuno e cólon. Jejuno tem mais CD8 expressando Foxp3 do que cólon ( $p = 0,0453$ ) (GRAF. 13 A). No animal infectado a frequência dessa marcação duplo-positiva também é maior do que em animal não infectado ( $p = 0,0219$ ).

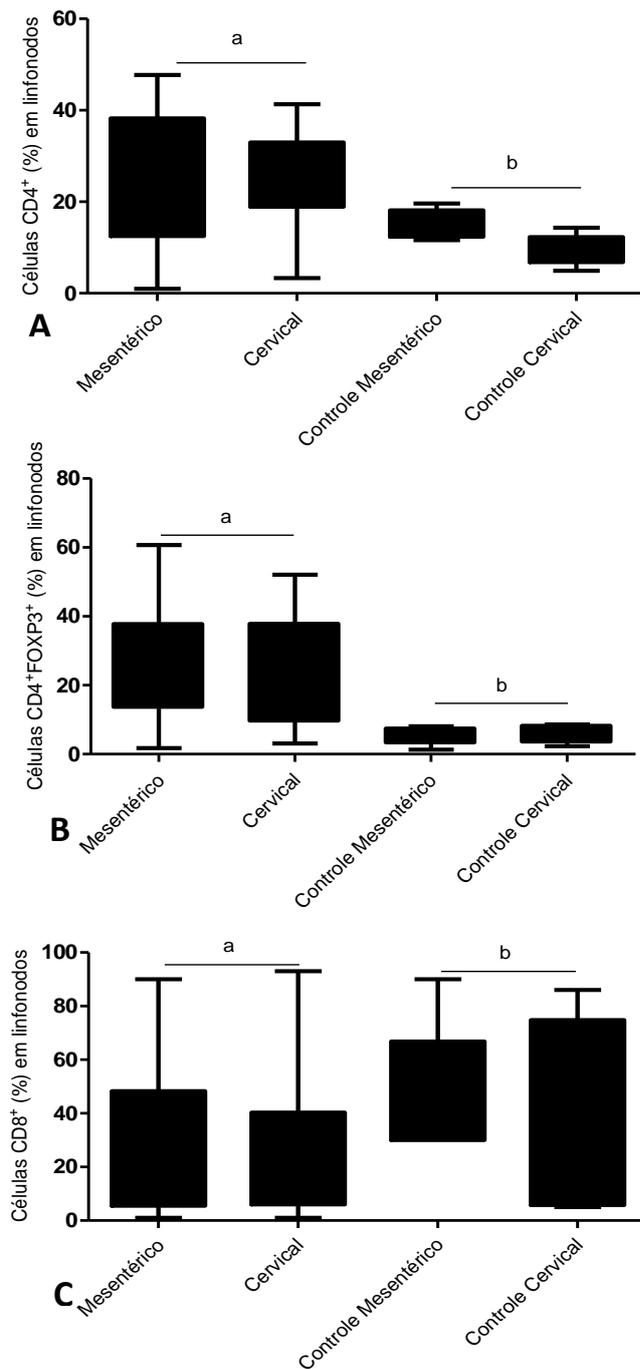
A avaliação da expressão de TLR2 e TLR9 também foi feita na população de linfócitos nos segmentos intestinais. Verificamos que a frequência de TLR9 não se diferenciou entre jejuno e cólon, mas foi superior em relação ao controle ( $p = 0,0221$ ). Entretanto a frequência de TLR2 foi maior no cólon ( $p = 0,0491$ ) em relação ao jejuno (GRAF. 13 B).



**Gráfico 13 - Porcentagem de receptores em linfócitos da lâmina própria de jejuno e cólon de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) CD8<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> ( $p = 0,0453$ ) entre jejuno e cólon; (B) TLR2<sup>+</sup> ( $p = 0,0491$ ) entre jejuno e cólon; (letras diferentes equivalem a diferença estatística).**

Na lâmina própria foi feita avaliação da IMF e a consequente comparação entre jejuno e cólon dos receptores aqui avaliados. Houve diferença quanto à expressão de TLR9 ( $p = 0,0002$ ), CD4 ( $p = 0,0342$ ); CD8 ( $p = 0,0067$ ); CD4/FOXP3 ( $p = 0,0361$ ) e CD11b ( $p = 0,0592$ ) com IMF mais intensa no jejuno. Ao contrário, a expressão de CD14 ( $p = 0,0253$ ) e TLR2 ( $p = 0,0170$ ) foi mais intensa no cólon. Já CD11c ( $p = 0,4705$ ) e Manose ( $p = 0,4720$ ) não apresentaram diferença na IMF entre jejuno e cólon. Em todos eles, o animal infectado tem IMF superior aos animais não infectados.

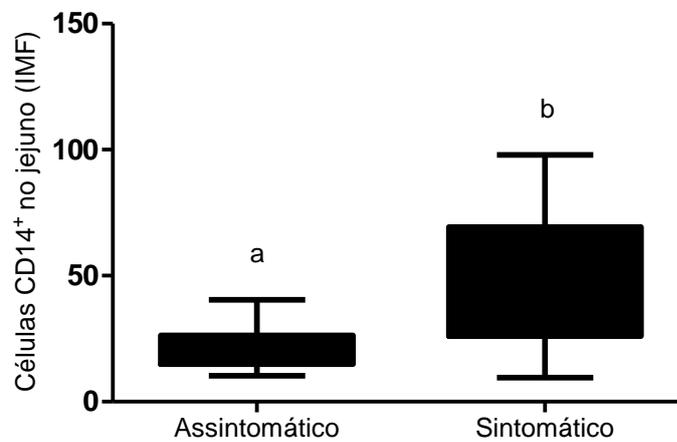
Foram avaliadas também a frequência e a IMF das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> nos linfonodos cervicais e mesentéricos. A porcentagem de positividade desses receptores se diferenciou somente em relação aos controles com  $p = 0,0090$  para CD4,  $p = 0,0002$  para Foxp3 e  $p = 0,0147$  para CD8 (GRAF. 14 A - C). Quanto à avaliação da IMF, essa revelou não haver diferença entre os linfonodos (CD4  $p = 0,9425$ ; CD8  $p = 0,9753$ ; e Foxp3  $p = 0,0564$ ). Isso nos levou a perceber que cães infectados expressam mais CD4 e Foxp3 (GRAF.14 A e B) e menos CD8 (GRAF. 14 C) que cães controle.



**Gráfico 14 - Porcentagem de receptores em linfócitos de linfonodos cervicais e mesentéricos de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*. (A) CD4<sup>+</sup> (p = 0,0090; (B) CD4<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup> (p = 0,0002); (C) CD8<sup>+</sup> (p = 0,0147); (letras diferentes equivalem a diferença estatística).**

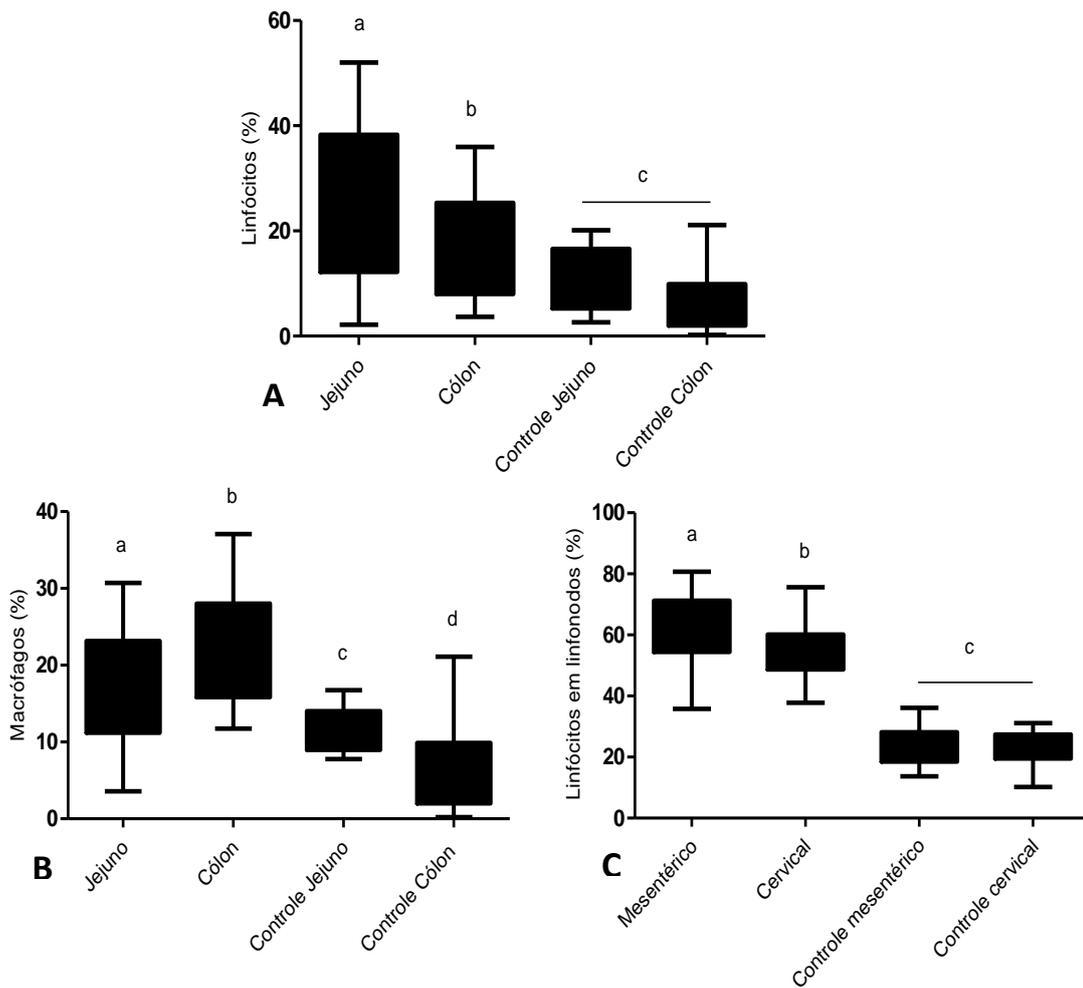
A comparação da frequência e da expressão dos receptores nas células da lâmina própria e linfonodos foi feita entre os animais assintomáticos e sintomáticos objetivando ressaltar se o estado clínico do animal tinha associação com a expressão dos receptores estudados. Apenas o receptor CD14 apresentou diferença entre cães assintomáticos e

sintomáticos no jejuno ( $p = 0,0247$ ), onde nos animais sintomáticos essa expressão foi maior (GRAF. 15).



**Gráfico 15 - Intensidade média de fluorescência de CD14 no jejuno de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados com *L. infantum chagasi* ( $p = 0,0247$ ); (letras diferentes equivalem a diferença estatística).**

Por fim a porcentagem total de macrófagos e linfócitos nos segmentos intestinais e nos linfonodos mesentéricos e cervicais foi avaliada apenas por tamanho e granulosidade. Observamos que macrófagos são mais frequentes no cólon ( $p = 0,0471$ ) do que no jejuno ao passo que os linfócitos foram mais frequentes no jejuno ( $p = 0,0201$ ) do que no cólon. Entre os linfonodos, foi o mesentérico que apresentou mais linfócitos do que o cervical ( $p = 0,0258$ ) (GRAF. 16 A - C) o que não aconteceu com os macrófagos. Cães infectados apresentam mais linfócitos e mais macrófagos que os não infectados tanto nos segmentos intestinais quanto nos linfonodos.



**Gráfico 16 - Porcentagem de macrófagos e linfócitos no jejuno, cólon e linfonodos cervicais e mesentéricos de cães naturalmente infectados com *L. infantum chagasi*: (A) frequência entre linfócitos no jejuno e cólon ( $p = 0,0201$ ) e em relação aos controles ( $p = 0,0024$ ); (B) frequência de macrófagos no jejuno e cólon ( $p = 0,0471$ ) e em relação aos controles ( $p = 0,0050$ ); (C) frequência de linfócitos entre linfonodos mesentérico e cervical ( $p = 0,0258$ ) e em relação ao controle ( $p = 0,0001$ ); (letras diferentes equivalem a diferença estatística).**

## 7.12 Citocinas no soro

A dosagem das citocinas IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  foi feita, por ELISA no soro de todos os cães. Não foi detectada diferença entre os níveis dessas citocinas entre cães positivos e negativos.

### 7.13 Citocinas no intestino

Foram dosadas as citocinas IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  no jejuno e cólon. IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram mais expressados no jejuno ( $p = 0,0032$ ;  $0,0025$ ;  $0,0020$  e  $0,0012$ , respectivamente) ao passo que IL-4 foi mais expressada no cólon ( $p = 0,0043$ ) (GRAF. 17 A – E).

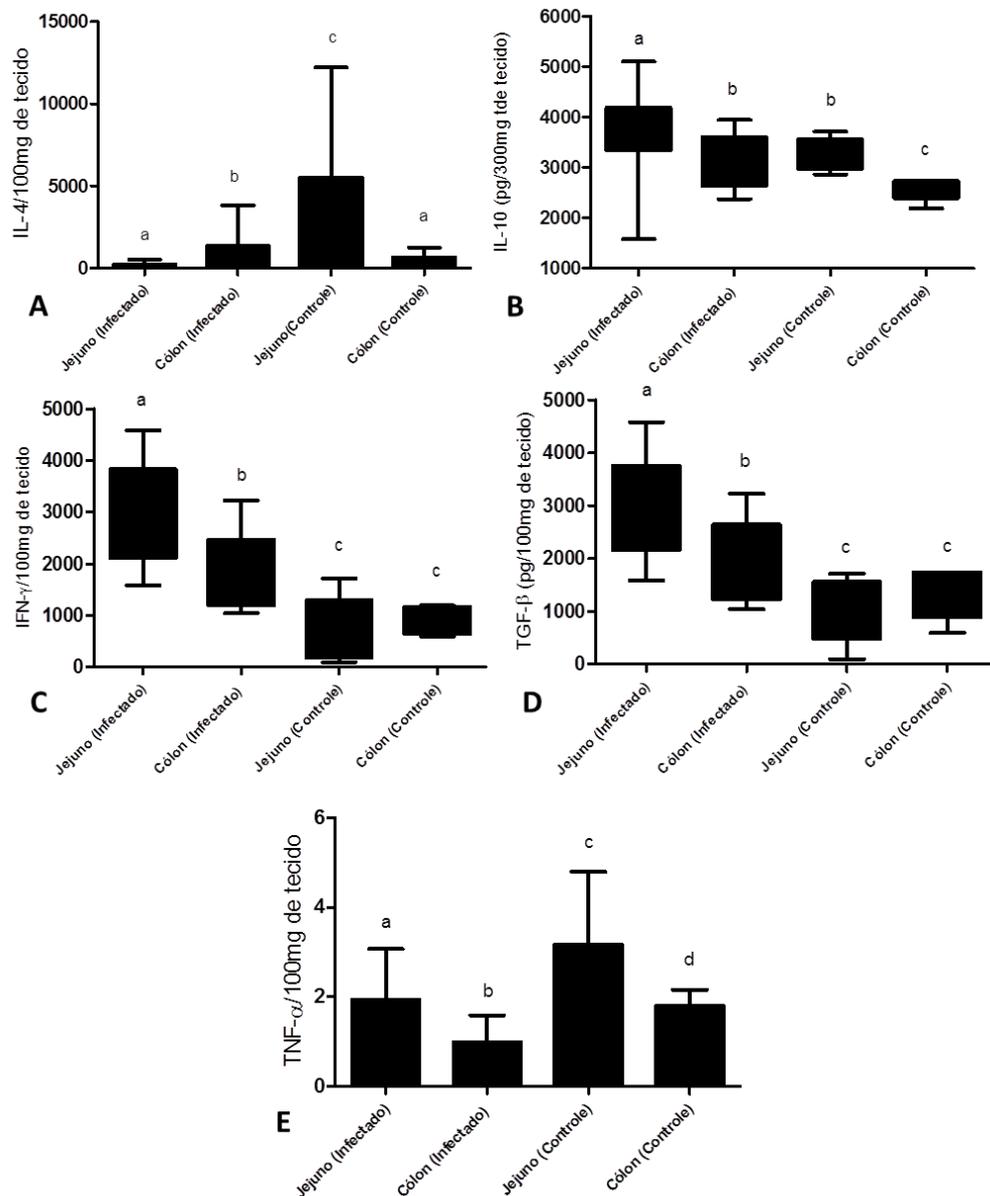


Gráfico 17 - Demonstração da concentração de citocinas em amostras de jejuno e cólon de cães infectados por *L. infantum chagasi*: (A) IL-4; (B) IL-10; (C) IFN- $\gamma$ ; (D) TGF- $\beta$  e (E) TNF- $\alpha$ ; letras diferentes equivalem a diferença estatística.

## 8 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral (LV) faz parte de um complexo sistema biológico que envolve o hospedeiro humano, parasito, vetor e na maioria dos casos um reservatório animal, sendo o cão o de maior relevância. O cão é responsável pela manutenção do parasito nos focos endêmicos e o reservatório mais importante no ciclo zoonótico da doença. Isso se deve à alta prevalência da enfermidade entre esses animais, à presença de formas amastigotas na pele e ao estreito convívio do cão junto ao homem (DEANE et al., 1962; ALVAR et al., 2004; WHO, 2010).

Os sinais clínicos sugestivos de LV canina assim como o tempo de manifestação variam entre os cães acometidos, assim podemos verificar dois polos de apresentação que partem de uma total ausência de sinais até a manifestação clínica grave da doença (CIARAMELLA et al., 1997). Essa diversidade pode ser consequência de interações complexas entre o parasitismo e a resposta imune do hospedeiro (SANTOS-GOMES et al., 2002). Diante da ampla apresentação clínica da LVC, nesse estudo os cães foram classificados em sintomáticos quando apresentavam sinais clínicos clássicos da doença como: lesões cutâneas localizadas preferencialmente na face como a pina e espelho nasal; onicogribose; emagrecimento progressivo (perda de massa muscular principalmente da face); lesões oculares como blefarites e/ou opacidade de córnea. Cães sem nenhum ou isentos de qualquer sinal clínico da LVC foram considerados assintomáticos. A ausência de sinais clínicos é frequentemente relatada em 50-60% dos cães com LV (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2010). O resultado da avaliação clínica dos animais desse trabalho reproduz o que já foi descrito na literatura quanto ao tipo e frequência das alterações encontradas em cães com LV (AMUSATEGUI et al., 2003; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). As dermatopatias encontradas nos cães avaliados nesse estudo também foram descritas por Baneth et al. (2008). Quanto à linfadenomegalia, alguns autores sugerem que assim como ocorre com as dermatopatias, não é possível estabelecer um perfil macro ou microscópico patognomônico do aumento dos linfonodos na LVC, mesmo com essa alteração estando presente em 60-90% dos animais (ALVAR et al., 2004; LIMA et al., 2004). A prevalência de oftalmopatias pode variar entre 16 e 81% (AMUSATEGUI et al., 2003). Essas alterações oftalmológicas parecem estar associadas, sobretudo à deposição de imunocomplexos sobre as células endoteliais, comumente formados em grande quantidade na LVC e à presença de inflamações granulomatosas em decorrência da infecção (PEÑA et al., 2000).

A perda de peso está presente em boa parte dos animais com LV, porém em frequência bastante variável. Nesse estudo 25% dos cães sintomáticos apresentavam-se com caquexia. Esse quadro se deve provavelmente a um desequilíbrio proteico, em virtude da proteinúria associada à deficiência imunológica crônica do animal doente (NIETO et al., 1992; AMUSATEGUI et al., 2003; ALVAR et al., 2004).

A resposta imune humoral na LVC é bastante intensa com produção de altos títulos de imunoglobulinas (PINELLI et al., 1994; NIETO et al., 1999; AMUSATEGUI et al., 2003; ALVAR et al., 2004). Embora esses anticorpos produzidos em grande quantidade não sejam efetivos na eliminação das formas amastigotas do parasito, são de grande importância no diagnóstico sorológico dos cães infectados, na realização de inquéritos epidemiológicos e no acompanhamento de cães submetidos à terapia anti-*Leishmania* (VERCAMMEN et al., 2002). Os testes sorológicos, de forma geral, são fundamentais na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* e os níveis altos de globulinas e proteínas totais parecem estar relacionados com a hipergamaglobulinemia presente na maioria dos casos de LVC, expressados, geralmente, em títulos elevados da RIFI e valores elevados de absorbância no teste de ELISA (BONFANTI et al., 2004; MIRÓ et al., 2008; 2011). Houve concordância entre os exames sorológicos prévios realizados pelo CCZ-Ribeirão das Neves com os realizados no laboratório de Sorologia de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do ICB. Esses testes são ferramentas de diagnóstico individual e de inquéritos populacionais mais utilizados na LVC (MAIA e CAMPINO, 2008). Todavia, o diagnóstico preciso da LVC é complexo, sendo necessária a associação de métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares (ALVAR et al., 2004), para se alcançar um resultado confiável. Segundo Solano-Gallego et al. (2009) o teste RIFI deveria ser utilizado em diluição reativa final, o que diminuiria o número de diagnósticos inconclusivos e de resultados falso-positivos. Então, parece haver consenso entre técnicas sorológicas, como a diluição reativa final da RIFI e os testes moleculares, devendo os mesmos serem utilizados na rotina clínica. Em todos os animais avaliados os títulos na RIFI positivo foram acima de 1:160. Exames complementares parasitológicos, teciduais como a IHQ e moleculares como a PCR, permitiram a identificação de DNA de *Leishmania* em todas as amostras de pele de orelha como já descrito por Figueiredo et al. (2010). Xavier et al. (2006) demonstraram sensibilidade de 87,2% na PCR realizada em amostras de pele. A demonstração em nosso trabalho, da presença de amastigotas em todos os cães, inclusive nos assintomáticos, pelas duas técnicas de diagnóstico parasitológico utilizadas, é um achado importante, já que a participação dos cães sem sinais clínicos da doença, na epidemiologia da LV é discutida por vários autores (ABRANCHES et al., 1998; LIMA et al., 2004; SOLANO-

GALLEGO et al., 2004) e o diagnóstico desses animais é essencial considerando sua capacidade de infectar o vetor (LEMOS et al., 2008).

As anormalidades cutâneas são demasiado comuns, porém, de extensão e caracterização variáveis na LVC (da-COSTA-VAL et al., 2007). O tegumento dos cães representa grande importância epidemiológica da leishmaniose, uma vez que é um dos órgãos mais acometidos clinicamente no curso da doença (FERRER, 1989; FIGUEIREDO et al., 2010) e constitui primeiro local em que se instala uma resposta imune no hospedeiro além, é claro de representar o sítio de contato entre o parasito e o vetor *Lu. Longipalpis* (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). A importância da pele como fonte de infecção para o inseto vetor vem sendo descrita há muito tempo. No Brasil, Deane (1955) relatou a presença de amastigotas na pele de 77,6% dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* no Estado do Ceará. Xavier et al. (2006) encontraram frequência de 70% de positividade dos cães assintomáticos, apresentando formas amastigotas em amostras de pele de orelha, detectadas por IHQ e nossos resultados estão de acordo com esses relatos. Da-Costa-Val et al. (2007) demonstraram que 18,3% dos cães assintomáticos infectaram flebotomíneos durante a realização de xenodiagnóstico, comprovando a participação destes animais no ciclo do parasito. Segundo Ferrer (1989), no cão, a pele é afetada durante a progressão da doença para os órgãos internos e muitas vezes é o indício da gravidade da doença, como visto nesse estudo. De fato, lesões histológicas como inflamação crônica constituída por exsudato de mononucleares do tipo plasmocitocitário na derme (difusa ou focal) com formas amastigotas no interior de macrófagos e alterações epiteliais como acantose, hiperqueratose, parakeratose e degeneração hidrópica foram encontradas em todos os animais como descrito na literatura (FIGUEIREDO et al., 2010).

Espleno e hepatomegalia são as lesões mais evidentes observadas na LVC (KEENAN et al., 1984a) como também observado nesse estudo. Além do que já foi descrito por Lima et al. (2007) e Reis et al. (2009), encontramos também fígados com áreas brancacentas distribuídas aleatoriamente na face parietal convexa e face visceral côncava somado à congestão e áreas sugestivas de degeneração. Sabe-se que a lesão básica na LVC ocorre devido ao envolvimento inicial dos macrófagos (KEENAN et al., 1984a), sendo que essas lesões estão relacionadas ao *status* imune do hospedeiro, uma vez que a doença aponta para um quadro histopatológico caracterizado pela hipertrofia e hiperplasia de células do SMM. As alterações histológicas encontradas no fígado dos cães desse estudo estão de acordo com o que foi encontrado por Tafuri et al. (2001). Assim como o fígado, o baço também representa um importante sítio de interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o parasito

*Leishmania*; sendo que todos os participantes obrigatórios contra o parasito estão presentes em larga escala, incluindo células apresentadoras de antígenos e linfócitos. De acordo com Moura (2007), bem como aqui observados, os achados macroscópicos esplênicos mais evidentes foram aumento de volume, aspecto rugoso da cápsula e congestão. A IHQ revelou que o órgão mais intensamente parasitado foi o baço, seguido da medula e pele, e esse resultado, está de acordo com aqueles descritos por Reis et al. (2006), que encontraram baços e peles de orelha mais intensamente parasitados que os demais órgãos avaliados, independente do grupo clínico dos animais. Essa é uma questão que precisa melhor estudada, pois, sabe-se que a distribuição dos parasitos, nos diferentes órgãos não é homogênea.

A linfadenomegalia é um achado clínico comum na leishmaniose (CIARAMELLA et al., 1997; LIMA et al., 2004; TOPLU e AYDOGAN, 2011). Nesse estudo, todos os animais apresentaram esse sinal clínico, sendo um dos mais prevalentes no grupo sintomático. De forma semelhante, Ribeiro (2007) encontrou linfadenopatia generalizada em 100% dos 24 cães naturalmente infectados por *L. chagasi* avaliados antes do tratamento. Outros autores como da-Costa-Val et al. (2007) e no trabalho de revisão de Alvar et al. (2004) também concordam que esse sinal clínico seja mais frequentemente encontrado em cães que manifestam clinicamente a doença. Após análise histológica observou-se linfadenite capsular com espessamento da mesma à custa da deposição colagênica observada em pelo menos 40% dos cães. Assim como observado por Toplu e Ayodan (2011) e Lima et al. (2004) a lesão fundamental nos linfonodos é o notável aumento da celularidade dos seios e cordões medulares caracterizando a chamada hiperplasia/hipertrofia da camada medular. Os autores sugerem que a condição imunopatológica presente no linfonodo constitui um reflexo da inflamação crônica difusa que ocorre na LVC. De acordo com Ciaramella et al. (1997) e Lima et al. (2004) linfonodos cervicais são mais acometidos. Segundo esses autores a maior reatividade desses linfonodos se deve à sua posição anatômica, uma vez que esses drenam as regiões cutâneas e subcutâneas da cabeça e orelha. Tais dados nortearam a inclusão dos linfonodos cervicais em nosso estudo, objetivando correlacioná-lo com os mesentéricos, pois esses além de intimamente relacionados ao TGI são fonte de células T reguladoras induzidas (SUFFIA et al., 2006).

A ocorrência de fenômenos inflamatórios no TGI de cães associada à presença de amastigotas nos macrófagos também tem sido reportada por outros autores (KEENAN et al., 1984a; GONZÁLEZ et al., 1990; FERRER et. al., 1991; HERVÁS et al., 1996; PINTO et al., 2011). Já foi descrita alteração inflamatória semelhante à aqui encontrada, tanto na mucosa quanto na submucosa do cólon de cães infectados por *Leishmania*, sem, contudo, presença de

células gigantes (GONZÁLEZ et al., 1990; FERRER et al., 1991). Hervás et al. (1996) também observaram esse mesmo tipo de lesão na mucosa e submucosa dos intestinos delgado e grosso de um chacal com leishmaniose visceral.

Como alteração clínica relevante, Tryphonas et al. (1977) e Toplu e Aydogan (2011) descreveram diarreia crônica de intestino grosso. E esse achado também foi observado por Ferrer et al. (1991) em dois cães com diarreia crônica mucosanguinolenta e que não respondiam ao tratamento com antibióticoterapia. Esses autores relataram que durante a biópsia a mucosa do cólon apresentava-se com hiperemia difusa associada a pequenas áreas de erosão. Na microscopia observaram corpos basofílicos em vacúolos citoplasmáticos de numerosos macrófagos. Como os animais viviam em área endêmica da LV foi realizado o exame de IHQ da biópsia intestinal e a confirmação da doença veio com a visualização de formas amastigotas de *Leishmania*. O autor descreveu a diarreia crônica como sendo a primeira manifestação clínica da LVC apresentada pelos animais do estudo. Em nosso trabalho não observamos diarreia nos cães infectados durante o tempo em que os animais ficaram sob nossos cuidados, uma vez que foram obtidos de área endêmica e não foi possível ter informações sobre o tempo de infecção. Essa observação, por sua vez, está de acordo com Adamama-Moraitou et al. (2007), na Europa, que não observou essas manifestações em animais naturalmente infectados com *L. infantum*. Entretanto os autores observaram através da biópsia de cólon, hiperemia da mucosa associada às áreas irregulares e/ou edema de mucosa e pequenas áreas de erosão classificando esses sinais como colite assintomática em cães com a doença visceral.

Em geral, durante a necropsia, não foram observadas alterações moderadas ou intensas ao longo de todo o TGI de todos os animais estudados (infectados e não infectados). De fato, observaram-se alterações apenas discretas como focos hiperêmicos (12%) da mucosa que poderiam sugerir enterite. Todavia, em mais de 60% dos casos era frequente a reatividade das placas de Payer, especialmente no íleo, que se apresentavam como nódulos brancacentos e elevados fazendo saliência na parede do órgão (serosa). Esses achados condizem com o que descreve Toplu e Aydogan (2011) ao observarem além do que encontramos. hemorragia no intestino delgado de dois cães sintomáticos e áreas de hemorragias puntiformes na superfície da mucosa intestinal em um cão assintomático. González et al. (1990) observaram espessamento difuso da parede do cólon e reto de cães experimentalmente infectados. Silva et al. (2002) encontraram áreas de espessamento de ceco e cólon, ocorrência de estenose sugestiva de fibrose e áreas de enterite no intestino delgado de seis cães naturalmente infectados que poderiam estar ou não envolvidos com a patogênese da LV. Hervás e

colaboradores (1996) relataram em um chacal (*Canis aureus*), hemorragia gástrica com formas amastigotas de *Leishmania* na mucosa do estômago. Trabalhos como os de Ferrer et al. (1991) e Adamama-Moraitou et al. (2007) mostraram que durante a colonoscopia os autores evidenciaram hiperemia de mucosa intestinal com áreas de pequenas erosões da mucosa em alguns animais do experimento.

A análise histológica dos segmentos do TGI de todos os animais infectados evidenciaram notável aumento da celularidade, não raro com características de infiltrado inflamatório, na lâmina própria e submucosa dos segmentos do TGI (com exceção do esôfago) em comparação com os animais controle. As células eram predominantemente mononucleadas sendo plasmócitos, macrófagos, linfócitos e 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, 2001) e experimentalmente (KEENAN et al., 1984a e b; GONZÁLEZ et al., 1990) infectados por *L. donovani* e *L. chagasi* foram encontrados. Em geral, macrófagos parasitados tinham morfologia peculiar com citoplasma hipocorado e vacúolos intracitoplasmáticos contendo formas amastigotas de *Leishmania*. Foi possível observar também células epitelióides (macrófagos aumentados de tamanho, citoplasma hipocorado, núcleo vesiculoso com cromatina frouxa) e/ou células gigantes (fusão de macrófagos e monócitos jovens) normalmente associadas com infiltrado mononuclear. Adamama-Moraitou et al. (2007) também observaram macrófagos parasitados no TGI. 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 o infiltrado mononuclear, eosinófilos na mucosa do intestino e somente em um animal observou vasculite necrosante com poucos neutrófilos ao redor dos vasos do intestino, rins, bexiga e pulmões. Em nosso estudo não foram encontrados piogranulomas, sendo que em menor proporção observou-se células polimorfonucleares como neutrófilos ou em menor proporção ainda, eosinófilos. Em alguns casos a hiperplasia dos folículos linfóides associados à mucosa, confirmando achados da macroscopia no íleo, foi encontrada alterando a arquitetura da lâmina própria que se deslocava em direção ao lúmen e à serosa. Esse resultado está de acordo com Silva et al. (2002).

A análise microscópica pôde revelar parasitismo sem surgimento de lesões. Todavia, na literatura, autores consideram que a inflamação crônica difusa encontrada no intestino grosso está associada à presença das formas amastigotas dentro de macrófagos. Devido à estimulação antigênica do parasito ocorre hiperativação do sistema imune e como resultado,

há infiltração de linfócitos e plasmócitos, juntamente com macrófagos parasitados. Isso explicaria fatores para perda de absorção de água e eletrólitos. Por outro lado, o animal que apresenta aumento da celularidade (infiltrado inflamatório) intenso na mucosa aliado ao parasito, porém sem lesões, explicaria o fato do parasitismo estar relacionado diretamente com a intensidade da resposta inflamatória, porém sem surgimento de sinais clínicos. Assim como descrito na literatura (SILVA, 2001; ADAMAMA-MORAITOU et al., 2007; TOPLU e AYDOGAN, 2011) não se pode estabelecer correlação precisa positiva ou negativa entre alterações microscópicas, como infiltrado celular e parasitismo e presença de lesões que induzem surgimento de sinais clínicos.

Como também observado por nós, Toplu e Aydogan (2011) encontraram no TGI aumento moderado da celularidade. Entretanto observamos também aumento intenso da celularidade nos animais avaliados. Os autores ainda descrevem que o infiltrado foi restrito à lâmina própria adjacente à muscular da mucosa. Resultados semelhantes puderam ser visto por Silva et al. (2002) e além do que foi descrito por esses autores foi observado também aumento de celularidade na submucosa. Todavia, Ferrer et al. (1991) após observar a marcação do parasito pela imuno-histoquímica, descreveram que não se conhece a razão pela qual o parasito se localiza na mucosa intestinal.

Nesse estudo, em todo o TGI, com exceção do esôfago, foi possível identificar formas amastigotas de *Leishmania*. Silva, (2001) e Pinto et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes e ainda conseguiram inferir que as marcações na camada mucosa tiveram tendência de maior concentração nas porções mais profundas, próximas à submucosa. Os autores ainda consideraram que esse fato pode ser melhor 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 os vasos de maior calibre. De fato, conseguimos encontrar maior concentração de marcações próximas à muscular da mucosa, na base da lâmina própria somente no intestino grosso. Já na região proximal do TGI caracterizada pelo estômago, duodeno e íleo, onde foram encontradas marcações positivas, as amastigotas se concentravam próximas ao lúmen intestinal, difundidas entre as vilosidades. Platt et al. (2008) descreveram 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 quase estéril até a chegada no cólon descendente onde a microbiota comensal residente consiste em  $10^{14}$  (SALZMAN et al., 2007) ou  $10^{12}$  (FAVA e DANESE, 2011) organismos por grama de conteúdo do lúmen intestinal. Já o intestino humano contém aproximadamente  $10^{14}$

bactérias/g de conteúdo intestinal pertencentes a 1.000 espécies (FAVA e DANESE, 2011). Analisando esses achados seria possível sugerir que no intestino delgado de cães, onde existem menos microrganismos comensais no lúmen intestinal comparado ao cólon, a *Leishmania* aparece difundida entre as vilosidades junto ao lúmen. Já no intestino grosso, onde existe microbiota residente em grande quantidade no lúmen e onde o sistema imunológico regula essa microbiota, o parasito encontra-se isolado da região, ficando concentrados próximo à base da lâmina própria como se esquivassem de onde o sistema imune teoricamente teria maior atividade de reconhecimento de antígenos. MacDonald et al. (2011) descreveram que no TGI de seres humanos saudáveis, os linfócitos T constituem um terço das células do intestino na lâmina própria, semelhante à proporção de plasmócitos produtores de IgA e também cita a presença de macrófagos e células dendríticas. O autor cita que o epitélio do intestino delgado contém aproximadamente um linfócito T para cada 10 células do epitélio intestinal, e já no cólon essa taxa pode chegar a um linfócito T para cada 20 células de epitélio intestinal. Com esse resultado inerente aos seres humanos, podemos sugerir que nos cães, a carga parasitária maior no intestino grosso tem correlação direta com a taxa de celularidade, apesar de não ter sido quantificado os tipos celulares e de ainda não se ter estudos desse tipo com intestino de cães. Entretanto, Nagashima et al. (1996) descreveram que os macrófagos não estavam localizados exclusivamente abaixo da camada epitelial que cobre a lâmina própria da mucosa, mas estavam distribuídos aleatoriamente por toda a lâmina própria do intestino. Esses achados levaram-nos a questionar se macrófagos intestinais caninos realmente atuam como primeira linha de defesa já que se localizam distantes das camadas epiteliais, pois sabe-se que composição microbiana alterada pode impactar o processo fisiológico no ambiente intestinal. Embora o objetivo da resposta imune clássica seja para eliminar os patógenos e proteger o hospedeiro, a resposta imune ativa no intestino saudável está orientada para a coexistência com a microbiota comensal. Deve-se levar em consideração também que não somente a microbiota estimula células da mucosa, talvez tanto quanto a microbiota, os antígenos alimentares induzem regulação intestinal, especialmente na porção proximal do intestino delgado (PABST e MOWAT, 2012).

Carga parasitária intensa no cólon foi comum nos animais infectados. Tanto Ferrer et al. (1991) quanto Adamama-Moraitou et al. (2007) observaram colite nos animais com e sem manifestação de sinais clínicos e visualização do parasito no intestino grosso. Entretanto, nos dois experimentos somente foram realizadas biópsias por colonoscopia para obtenção de amostras sendo que não se coletou amostras de intestino delgado. Com exceção do trabalho de Silva et al. (2002) e Pinto et al. (2011), não existem relatos quanto ao estudo das várias

regiões do TGI de cães infectados com *Leishmania*. Em seus trabalhos, os autores avaliaram seis regiões distintas de todo o TGI de cães, a saber estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon. No presente trabalho incluímos outras duas regiões: esôfago e reto, sendo que não encontramos marcações positivas de *Leishmania* no esôfago. Já 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 do esôfago.

A avaliação morfométrica das células da lâmina própria de todos os segmentos do TGI revelou maior celularidade nos animais infectados comparados aos 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 (2001) fez avaliação qualitativa das células da lâmina própria da mucosa dos segmentos do TGI. Os resultados aqui apresentados vão de encontro aos achados desses autores. Em adição, trabalhos que utilizaram animais experimentalmente infectados com *Leishmania* (GONZÁLEZ et al., 1990; KEENAN et al., 1984b) também obtiveram resultados semelhantes. O TGI é um dos sistemas que possuem grande relação com meio externo e a exposição à elevada quantidade 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 e manutenção da homeostase intestinal. Defeitos nesse equilíbrio podem prejudicar esse mecanismo e levar à inflamação intestinal crônica (MacDONALD et al., 2011). Pelo que pudemos observar, a *Leishmania* não quebra a homeostase intestinal apesar de termos observado notável parasitismo e aumento de celularidade na lâmina própria da mucosa e submucosa nos diversos segmentos do TGI.

A análise morfométrica do epitélio mostrou que os animais infectados apresentaram aumento epitelial na região do duodeno em comparação ao grupo controle. González et al. (1990) descreveram alterações degenerativas na superfície epitelial da mucosa de intestino grosso evoluindo para microerosões da mucosa do cólon. Curiosamente MacDonald et al. (2011) descreveram em seres humanos o papel do epitélio como importante na regulação da homeostase e como fator pró-inflamatório. Células epiteliais do TGI produzem TGF- $\beta$ , que pode reduzir a resposta pró-inflamatória das células T na lâmina própria. De fato, em nossos experimentos, todos os animais infectados apresentaram aumento da celularidade (infiltrado inflamatório) em um ou mais segmentos do TGI.

O sistema imune do hospedeiro apresenta papel central no estabelecimento da infecção. Como as *Leishmanias* são parasitos intracelulares obrigatórios que residem quase que exclusivamente em células mononucleares fagocitárias de seus hospedeiros vertebrados (CHANG e FONG, 1983), o conhecimento dos componentes envolvidos na resposta frente a esse protozoário é importante para chegar ao seu mecanismo de sobrevivência. Vários componentes da resposta inata participam de mecanismos de defesa contra protozoários e o processo de internalização das formas metacíclicas infectantes pode ser mediado por receptores presentes na superfície de células do SMM, os quais são citados os receptores da porção FC (WOELBING et al., 2006), receptores de manose (BLACKWELL, 1985), receptores TLR2 e TLR9 (FLANDIN et al., 2006) e receptores do complemento do tipo 3 (CD11b) (MOSSER e EDELSON, 1985).

TLRs são receptores de reconhecimento de padrões essenciais que medeiam o reconhecimento das estruturas microbianas e induzem resposta inflamatória e adaptativa. Vários estudos têm mostrado o reconhecimento de moléculas derivadas de *Leishmania* por diferentes TLRs. Recentemente foi demonstrado TLRs na ativação de células imunes, incluindo macrófagos e células dendríticas, através do reconhecimento de componentes microbianos incluindo LPS e LPG (NISHIO e HONDA, 2012). A expressão de TLRs em compartimentos anatômicos distintos no epitélio intestinal é necessária para evitar excesso de estimulação (ORTEGA-CAVA et al., 2003; IWASAK e MEDZHITOV, 2004; TESTRO e VISVANATHAN, 2009). TLRs são expressados a baixos níveis na lâmina própria normal, mas são super-regulados em doença inflamatória intestinal (NISHIO e HONDA, 2012).

Macrófagos são células derivadas de monócitos altamente flexíveis e adquirem fenótipos distintos após exposição a diferentes moléculas ativadoras além de adquirir funções de acordo com o microambiente (NATHAN et al., 1983). Macrófagos residentes da LP intestinal desempenham papel importante na homeostase da mucosa do TGI. Esses macrófagos, no jejuno e cólon, estão localizados na LP, logo abaixo do epitélio (LEE et al., 1985) e na região das placas de Peyer e constituem entre 10-20% das células mononucleares intestinais (DONNELLAN, 1965). Estudos recentes têm demonstrado que macrófagos humanos do cólon expressam o receptor CD11b e CD11c, além de uma variedade de TLRs funcionais, integrinas CD11a, b, c e receptores CD14 (ROGLER e ANDUS, 1998; HAUSMANN et al., 2002). Sabe-se também que macrófagos intestinais regulam negativamente TLRs após sua chegada à mucosa, embora o mecanismo subjacente seja desconhecido (PLATT e MOWAT, 2008).

Evidências demonstram que TLRs estão envolvidos na homeostase imunológica do TGI e que esses são expressados de forma diferente na intensidade e compartimentalização nos diversos segmentos do intestino. Maior expressão de TLR2 no intestino grosso (cólon) em relação ao intestino delgado (jejuno) foi observada nos animais infectados. Sabe-se que células epiteliais das criptas expressam TLR2 (FURRIE et al., 2005) com expressão moderada no intestino delgado e grosso (ISHII et al., 2006). Burgener e colaboradores (2008), utilizando RT-PCR, detectou mRNA que codifica para TLR2 no duodeno e cólon de cães com desordens crônicas intestinais. Ao contrário dos nossos achados, esses autores mostraram maior expressão de TLR2 no intestino delgado. Já Vivarini et al. (2011) sugerem que TLR2 facilita o estabelecimento da doença, de acordo com as espécies de *Leishmania* em questão. TLR2 é expressado em baixos níveis nas células não estimuladas do cólon de cães e podem ser super-regulados em resposta a peptídeoglicanos ou LPG (SWERDLOW et al., 2006). O curioso é que realmente encontramos mais TLR2 no cólon de cães infectados associado à carga parasitária elevada. A baixa expressão de TLR2 no cólon de cães saudáveis comparada aos segmentos do intestino delgado pode ser devido ao fato do duodeno ter diversidade bacteriana menor do que o cólon, pois é relatada ativação direta de TLR2 por componentes da *Leishmania* (BECKER et al., 2003).

Nesse estudo houve correlação direta entre TLR2 e carga parasitária levando à hipótese que o TLR2 esteja envolvido no reconhecimento do parasito durante a leishmaniose visceral. Todavia, essa correlação dificulta a avaliação de como essa associação está implicada na não eliminação do parasito, e como o parasito modula positivamente a estimulação de TLR2. Há um relato (VIVARINI et al., 2011) de que a perpetuação da infecção por *L. amazonenses* foi dependente de TLR2 indicando que esse receptor é requerido para o sucesso da infecção em macrófagos por essa espécie. Esses achados sugerem que TLR2 pode desempenhar função em facilitar o estabelecimento da doença, dependendo da espécie de *Leishmania*. Outros estudos reforçam esse raciocínio onde hipotetizam que mecanismos dependentes de TLR2 poderia também contribuir para a evasão ou inibição de resposta efetiva contra patógenos como *Yersinia enterocolitica* embora já tenha sido proposto que TLR2 desempenha papel importante durante a infecção na indução da fagocitose de *Leishmania* (FLANDIN et al., 2006). De acordo com Cezário et al. (2011), a infecção por *L. chagasi* resulta na modulação de TLR2 no baço e de citocinas relacionadas. O LPG presente na superfície de formas promastigotas de *Leishmania* possui participação no reconhecimento inicial desses protozoários por macrófagos do hospedeiro vertebrado (HANDMAN e BULLEN, 2002), sendo que a ação desses glicoconjugados, junto a receptores da resposta

inata, como os receptores TLR, tem sido investigada (de VEER et al., 2003; KAVOOSI et al., 2010). Já em outros estudos, com finalidade de pesquisar o papel do TLR2 e TLR9 no curso da infecção com *L. major*, Kavooosi et al. (2010) avaliaram a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos após estímulo com LPG na presença e ausência de TLR2. Os resultados indicaram que TLR2 apresenta importante papel no curso da doença por promover ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e indução final de NO.

Na verdade é pouco o que se sabe a respeito de TLRs no intestino canino, com exceção de que TLR2 e TLR4 são expressados em níveis reduzidos em células epiteliais colônicas e que esses podem ser regulados positivamente em resposta a estímulo com peptidoglicano e lipopolissacarídeos (FURRIE et al., 2005). A super-regulação de TLRs em macrófagos intestinais caninos obtidos a partir da LP do jejuno e cólon poderia ser explicado através do recrutamento de células inflamatórias que expressam TLRs ou por proliferação de macrófagos residentes induzidas por antígenos de *Leishmania*. Diferente de TLR2, TLR9 em ratos, pode ser regulado e expressado na superfície celular, onde participa na ativação celular e conduz à inflamação ou à tolerância. Nos seres humanos TLR9 tem sido implicado na ativação de células NK, evento essencial para a produção de IL-12 por células dendríticas (SCHLEICHER et al., 2007). Em equinos, há aumento de TLR9 após sua ativação (ZHANG et al., 2008). Resultados semelhantes foram observados em cães com distúrbios intestinais (BURGENER et al., 2008).

Associação entre menor carga parasitária e maior frequência de TLR9 foi observada sugerindo que TLR9 se correlaciona com a resistência local da infecção. TLR9 induz produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 por células T reguladoras. Curiosamente encontramos no segmento intestinal mais TLR9 onde também foi expressado mais IL-10 (HAYASHI e RAZ, 2006) e coincidentemente menos amastigotas indicando que TLR9 poderia levar à imunidade protetora contra o parasito.

Burgener et al. (2008) descreveram células TLR9<sup>+</sup> em todos os segmentos do TGI, com expressão significativamente mais elevada no íleo em relação ao jejuno, estômago e cólon. Em nosso caso, a expressão de TLR9, em cães com LV, foi maior no jejuno em relação ao cólon. Encontramos também correlação entre frequência mais elevada de macrófagos CD11b<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup> expressando TLR9 no jejuno em relação ao cólon. Em cães com LV, monócitos periféricos TLR2<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> (AMORIM et al., 2011) e macrófagos hepáticos CD11b<sup>+</sup>/CD18<sup>+</sup> (LIMA et al., 2007) parece ser células eficazes para reduzir a carga parasitária em tecido. Em contraste, macrófagos esplênicos (monócitos-macrófagos) podem servir para perpetuar a infecção intracelular (STRAUSS-AYALI et al., 2007). CD11b e CD14 são

receptores envolvidos na interação e na produção de citocinas pró-inflamatórias (de VEER et al., 2003). No entanto, macrófagos residentes intestinais não expressam antígenos CD11b e CD14 em TGI saudável de forma elevada. Isso sugere que a presença de *Leishmania* na LP pode modificar de certa forma a expressão de receptores, gerando mediadores responsáveis pela quimiotaxia de monócitos circulantes para a mucosa. Além disso, esses monócitos recentemente recrutados podem não ter tido tempo suficientemente longo para a diferenciação, ou pode ser que a presença da *Leishmania* aumente os níveis de sinais imuno-estimuladores que ultrapassam os processos habituais de regulação (ORTEGA-CAVA et al., 2003; PLATT e MOWAT, 2008). Os parasitos também podem proporcionar a estimulação de TLR9 por esses macrófagos como já foi relatado em cães com distúrbios intestinais crônicos (BURGENER et al., 2008). Por conseguinte, a correlação entre frequência de células CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> expressando TLR9 no jejuno, associada a uma carga parasitária reduzida nesse local, sugere que TLR9 pode ser eficiente na indução da resposta contra *Leishmania* conduzindo à imunidade protetora contra o parasito. Em verdade, a infecção estimulou o aumento da expressão de TLR9 visto que o cão não infectado apresentou níveis basais desse receptor. No entanto, é viável interpretar esses resultados com cautela, mais estudos precisam ser feitos para correlacionar expressão de TLR com potencial desempenho para esses receptores na geração de respostas em leishmaniose. O aumento da expressão de TLR2 no cólon e de TLR9 no jejuno pode ter ocorrido em consequência do tipo de ambiente inflamatório, tornando difícil de avaliar em que alcance a ativação dos TLRs está implicada nessas descobertas. É intrigante que TLR2 seja coexpressado e interage fisicamente com CD14, um correceptor de TLR2 (IWAKI et al., 2002) por coincidência encontramos mais TLR2 e mais CD14 no mesmo segmento intestinal. Em doença inflamatória intestinal há alta expressão de CD14 (TAKEDA et al., 2005a), como também o é no cólon de cães com LV.

CD11b (CR3) é descrito como receptor capaz de potencializar a internalização e sobrevida de formas amastigotas de *Leishmania* opsonizadas com a fração C3bi do complemento (MOSSER e EDELSON, 1985). Gonçalves et al. (2005) e Sampaio et al. (2007) descreveram a importância *in vitro* do CR3 na interação de monócitos circulantes caninos com *L. chagasi*. Amorim et al. (2011), em estudos *in vivo*, verificaram que cães naturalmente infectados com *L. chagasi* com resultado de IHQ e xenodiagnóstico negativos apresentaram, no sangue periférico, maior IMF de CD11b quando comparado aos valores observados em cães que apresentaram-se positivos nos dois exames parasitológicos. Assim, poderíamos levar à hipótese de que, pelo fato do jejuno ter quantidade ínfima de parasitos comparada ao cólon, a efetiva eliminação de parasitos no jejuno pode se tornar possível a partir do momento em

que células expressem, concomitante aos outros receptores já mencionados, maior quantidade e intensidade a integrina CD11b. Macrófagos CD11b<sup>+</sup> também podem inibir a regulação intestinal já que podem induzir *in vitro* diferenciação de iTreg (linfócito T Foxp3<sup>+</sup> induzido) em camundongos. Macrófagos intestinais permanecem em estágio de ativação parcial (RUGTVEIT et al., 1997) que permite imunidade protetora e mantém a homeostase sendo também capazes de eliminar os parasitos. O exato mecanismo pelo qual os macrófagos protegem alguns modelos animais da inflamação intestinal não é esclarecido, mas esse mecanismo pode envolver moléculas correguladoras secretadas por eles. Células CD11b<sup>+</sup> esplênicas produzem quantidade significativa de TNF- $\alpha$  e IL-10 em resposta a estímulo com LPS (TAKEDA et al., 2005a). Macrófagos intestinais CD11b<sup>+</sup> são potentes indutores de Treg (COOMBES et al., 2007a e b) e coincidentemente encontramos correlação direta entre CD11b, IL-10, TNF- $\alpha$  e Treg.

Locksley e Louis (1992) citam que a resolução da infecção por *Leishmania* depende basicamente da habilidade do hospedeiro em articular uma resposta imune mediada por células com predomínio de linfócitos T CD4 e CD8. Sabe-se que a resposta mediada pelas células T ativadoras da resposta celular é extremamente efetiva no mecanismo de defesa contra agentes intracelulares como os protozoários. Suas ações são decorrentes da secreção de citocinas que vão ativar macrófagos para destruir os agentes intracelulares ou através da citotoxicidade mediada por células T CD8. A importância dos linfócitos T CD4 na resolução da LVC vem sendo investigada por vários grupos de pesquisa (ALVAR et al., 2004; MOURA, 2007; REIS et al., 2009). Assim, observou-se que cães naturalmente infectados com *L. chagasi* que apresentavam manifestação ativa da doença, apresentavam concomitante redução da porcentagem de linfócitos T CD4 quando comparado aos níveis verificados para os cães normais (BORDOISEAU et al., 1997). Alvar et al. (2004) relatam que a diminuição da população de linfócitos T CD4 está diretamente relacionada à progressão da doença e infectividade junto a *Lu. Longipalpis*, uma vez que existe uma real incapacidade do hospedeiro em controlar a disseminação do parasito. Em adição, vários investigadores demonstraram ausência de imunidade específica mediada por células em cães infectados, caracterizados pela presença de parasitos e uma frequência reduzida de células T CD4<sup>+</sup> (MORENO et al., 1999; PINELLI et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Esse raciocínio confirma a estratégia comumente usada por microrganismo para estender sua sobrevivência: induzir uma resposta reguladora geralmente associada ao término da resposta imune efetora do hospedeiro.

O tecido linfóide gastrointestinal contém aproximadamente 50% de todos os linfócitos no corpo e acredita-se desempenhar papel importante na imunidade tanto local quanto sistêmica, incluindo a modulação da resposta imune. Os componentes principais do sistema imunológico gastrointestinal em humanos incluem linfócitos T e B, células dendríticas na lâmina própria e linfócitos intra-epiteliais. Assim, as células T podem ser de particular importância para a regulação imune local (MAKITA et al., 2004). Apesar desse potencial estímulo imunitário, é bem sabido que as respostas imunes no intestino permanecem num estado de inflamação controlada (HOLMGREN e RUDIN, 1999). Células Foxp3<sup>+</sup> induzidas na periferia (órgãos linfóides) constitui 10% de T CD4<sup>+</sup> em todos os órgãos, ao passo que na lâmina própria, elas somam mais de 30% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> enquanto as células T denominadas T reguladoras (Treg) e mesmo ditas reguladoras naturais (nTreg) somam apenas 1-2% de células T CD4 perifericas (ITOH et al., 1999; ATARASHI et al., 2011). Foxp3 é expressado principalmente em linfócitos T CD4 e em linfócitos T CD4/CD25 como também em linfócitos T CD8 (KINIWA et al., 2007; LE et al., 2011) e manter o equilíbrio entre ativação e supressão da inflamação é seu principal atributo (MAURYA et al., 2010).

A capacidade das células Foxp3<sup>+</sup> de resolver uma reação inflamatória já estabelecida levanta a possibilidade de que essas células possam ser úteis como agentes terapêuticos para doenças inflamatórias crônicas em humanos (UHLIG et al., 2006). Células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup>, Th3 produtoras de TGF-β e células Treg produtoras de IL-10, todas com função de regulação, previnem a inflamação crônica da mucosa e o estabelecimento da colite (TAKEDA et al., 2005a e b). O sistema imune da mucosa é considerado o sítio primário de geração de Treg induzida (CUROTTO de LAFAILLE e LAFAILLE, 2009) que se desenvolve sob estímulos da inflamação crônica (SAKAGUCHI et al., 2004, 2008; ZHOU et al., 2009) ou durante a homeostase normal do intestino. De fato, foi demonstrado que, durante a cura da colite experimental, células T CD4<sup>+</sup> proliferam e se acumulam nos linfonodos mesentéricos e na lâmina própria do cólon. Em ambos, a progênie das células Foxp3<sup>+</sup> está em correlação direta com as células dendríticas presente nos acúmulos linfóides intestinais, bem como no local da inflamação. Elas têm a habilidade de suprimir células efetoras e sua principal identificação é o fator de transcrição Foxp3 (IZCUE et al., 2009). As células dendríticas são essenciais na apresentação de antígenos além de participar diretamente na geração induzida de Treg na mucosa intestinal (KRETSCHMER et al., 2005). Elas são capazes de migrar tanto para as placas de Peyer quanto para os linfonodos mesentéricos e ativar as células T. Seguramente ainda há muito a ser aprendido sobre a função de Treg advinda do timo e das de indução periférica na infecção por protozoários como a *Leishmania*. É provável que os

mecanismos pelos quais a célula Treg previne ou cura a colite se diferem. Certamente, na colite, Treg deve controlar a ativação de uma população predominantemente de células T jovens, enquanto que na cura eles devem agir induzindo resposta inflamatória com predominância de células T já ativadas.

Os resultados histológicos e parasitológicos desse estudo demonstraram que cães infectados abrigaram mais parasitos no ceco e cólon do que nos outros segmentos do TGI. Isso é consistente com outros relatos como descrito anteriormente. Além disso, vimos também que o local que alberga mais parasito, o cólon, demonstra menor frequência e menor expressão de CD4<sup>+</sup> e Foxp<sup>+</sup> embora os cães sem LV também expressaram menos CD4 no cólon em relação ao jejuno, todavia, o parasito pode ter estimulado maior expressão desse receptor. Em algumas circunstâncias, o que poderia estar acontecendo no cólon, por exemplo, é que a regulação exercida pelas células Treg é excessiva evitando o estabelecimento de uma resposta imune protetora ao passo que em outras circunstâncias, esse controle não é suficiente para prevenir lesões. Sabe-se que muitos patógenos desenvolvem mecanismos para manipular a rede reguladora do hospedeiro em seu proveito. Embora a versatilidade do sistema imune seja evidente, os mecanismos detalhados para essa diversidade ainda não estão esclarecidos. A persistência do parasito, como resultado de supressão ou regulação imune por Foxp3<sup>+</sup> é necessária para a manutenção de imunidade protetora contra o parasito (SUVAS et al., 2004). Uma força motriz para a diversidade de desempenho da defesa imune seria a variedade de microambientes ao qual o hospedeiro tem de se adaptar. Na mucosa, pelo fato de ser um microambiente peculiar, um dos mecanismos chave para a regulação da defesa é a geração ou recrutamento de células Treg (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; MacDONALD e MONTELEONE, 2005; GAZZINELLI e DENKERS, 2006).

Treg intestinal aparece para contribuir grandemente na homeostase do TGI via vários mecanismos e modulando diferentes tipos celulares. Em certas infecções parasíticas persistentes, como é o caso da leishmaniose, Tregs auxiliam em manter o estágio pré-imune: uma forma de resistência que persiste apenas na presença do parasito e que acaba quando o parasito é eliminado por células ativadas (PETERS e SACKS, 2006). O processo imune subjacente à infecção por *Leishmania* é resultante da ativação de macrófagos da lâmina própria e de células dendríticas, conduzindo à proliferação de linfócitos. Sabe-se que tanto células dendríticas quanto macrófagos colônicos estão envolvidos no desenvolvimento de células Th17 no intestino e isso sugere que células dendríticas se adaptam de forma diferente dependendo das condições intestinais (NISHIO e HONDA, 2012).

Observamos que no jejuno tem expressão mais elevada de TLR9 e simultaneamente maior expressão de Foxp3<sup>+</sup>. Sabe-se que célula Foxp3<sup>+</sup> é controlada diretamente ou indiretamente por TLRs. Por outro lado TLR2 suprime Treg diminuindo a expressão do fator de transcrição Foxp3 (SUTMULLER et al., 2006a e b). Por coincidência, no segmento intestinal (côlon) onde encontramos mais TLR2, encontramos menos Treg. Por sua vez, TLR9 influencia o acúmulo de Tr1 (produtora de IL-10) e Foxp3<sup>+</sup> no intestino (MAYNARD e WEADER, 2009) e o interessante é que encontramos mais TLR9 onde tem mais expressão de Foxp3. Sabe-se, portanto que a sinalização direta de TLR em Treg pode ter uma influência positiva em sua função (IWASAKI e MEDZHITOV, 2004). Compartimentos diferentes do TGI podem prover diferentes condições que induzem a diferenciação de linfócitos TCD4 em várias linhagens. No íleo de camundongos, por exemplo, tem abundância de Th17 e no intestino delgado tem acúmulo de T Foxp3<sup>+</sup> (IVANOV et al., 2009).

Nesse estudo a correlação entre células inflamatórias e células CD4<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> foi positiva no linfonodo mesentérico, enquanto no linfonodo cervical foi negativa. Por sua vez a correlação entre carga parasitária e CD4<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> foi positiva no linfonodo mesentérico enquanto no linfonodo cervical, foi negativa. Nesse trabalho não observamos diferença significativa de células CD4<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> entre linfonodos mesentéricos e cervicais, demonstrando que a linfadenomegalia observada nos cães não foi devido ao aumento parcial de um tipo de células sobre outro, mas sim, uma expansão geral de todas as subpopulações de linfócitos. Entretanto, a infecção induziu aumento da expressão de CD4<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> e redução de CD8<sup>+</sup> como também observado nos segmentos intestinais.

A técnica de ELISA em sobrenadante de macerado de tecido da parede intestinal permitiu a constatação da expressão das citocinas IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  mesmo em níveis discretos. Esses resultados sugerem que a expressão dessas citocinas no intestino dos cães com LV não é um bom indicador de resistência, ao contrário do que ocorre no modelo murino. Encontramos níveis diferentes de expressão de IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes de macerado de jejuno e cólon. O jejuno apresentou mais IL-10 e o cólon apresentou mais IL-4 sugerindo que a expressão dessas citocinas no intestino não pode ser associada à progressão da doença, já que foram encontrados níveis semelhantes nos cães com diferentes formas clínicas da LV. Os níveis de IL-10, IL-4 e TNF- $\alpha$  nos cães naturalmente infectados foram significativamente superiores em relação aos cães não infectados, indicando que a infecção promoveu aumento da expressão dessas citocinas nos segmentos intestinais, embora a mesma não esteja relacionada ao *status* clínico da doença, já que apresentou níveis semelhantes entre cães sintomáticos e assintomáticos.

TLRs induzem a secreção de citocinas inflamatórias tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (NISHIO e HONDA, 2012). TLR2 está associado à expressão de IL-4 em modelo murino e há relatos de que TLR2 inibe produção de TNF (IWAKI et al., 2002) coincidindo com o que observamos em nosso estudo: onde há mais TLR2 há menos TNF- $\alpha$  e mais IL-4. Por sua vez, TLR9 está associado à expressão de TNF e IFN- $\gamma$  (SANDIG e BULFONE-PAUS, 2012) coincidindo novamente com nossos resultados, pois houve correlação direta entre TNF- $\alpha$  e TLR9. Essa citocina atua induzindo a produção de NO, responsável pela morte das amastigotas no interior dos macrófagos (LIEW O'DONNELL 1993). Interessante que em nosso trabalho, nos cães infectados, NO foi observado em maior quantidade em relação aos cães não infectados (dados não mostrados). Dessa forma, sugere-se que a expressão de TNF- $\alpha$  no jejuno está associada ao controle da doença, já que níveis mais elevados foram encontrados no segmento com menos parasito. A produção de TNF- $\alpha$  parecer ser importante porque tem papel na formação e manutenção do granuloma (MURRAY et al., 1992) e justamente onde encontramos mais TNF- $\alpha$  observamos mais formação de granulomas. Em experimentos com hamsters inoculados com amastigotas de *L. chagasi* mostrou que a formação de granuloma tem função importante no controle da infecção no sítio de inoculação, demonstrando que a disseminação da infecção ocorreu nos primeiros 45 dias antes da formação o granuloma no local (LAURENTI et al., 1990). Esse resultado é similar ao de Lima et al. (2007), que observaram correlação inversa entre carga parasitária e granulomas no fígado de cão infectado com *Leishmania chagasi*.

Altos níveis de TNF poderiam promover a geração de linfócitos produtores de IL-10 como uma resposta homeostática em ambiente com inflamação excessiva. O fato de termos encontrado menos TNF- $\alpha$  no cólon, onde encontramos mais macrófagos parasitados pode ser explicado pelo fato de que a fagocitose da *Leishmania* por macrófagos, ao contrário do que se observa com outros patógenos, é marcada pela ausência de muitas citocinas pro-inflamatórias (CARRERA et al., 1996).

Brachelente et al. (2005) compararam a expressão de algumas citocinas em fragmentos de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* com cães não infectados, normais ou apresentando flebite. Nesse estudo, os autores constataram que os animais com LVC apresentaram níveis mais elevados de expressão de IFN- $\gamma$ , IL-4 e TNF- $\alpha$  que os grupos controle, indicando que a infecção levou ao aumento da expressão dessas citocinas. Esses autores ainda evidenciaram que a expressão de IL-4 foi associada à maior gravidade da doença e com alta carga parasitária, embora não tenham realizado comparação entre as formas assintomáticas e sintomáticas da doença. Dessa maneira, esses autores demonstraram que a

forma clássica da LVC está associada a um padrão de resposta com produção de citocinas anti-inflamatórias na pele dos animais infectados. Assim como Brachelente et al. (2005) os níveis de IL-4 nas amostras de pele foram superiores nos cães com doença grave no estudo de Alves et al. (2009). Dessa forma, esse trabalho revelou que tanto IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quanto IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  foram superiores nas peles de orelha dos cães sintomáticos em relação aos cães assintomáticos. Esse balanço na expressão de citocinas mostra a complexidade da infecção canina em relação aos sistemas estudados no modelo murino com *L. major*, onde se verifica uma clara dicotomia na produção de citocinas. No trabalho de Alves e colaboradores (2009) o balanço final deve ter favorecido as citocinas reguladoras que provavelmente inibiram a atuação das citocinas pró-inflamatórias, já que os cães desse grupo desenvolveram sinais clínicos da doença e apresentaram altas cargas parasitárias na pele, indicando que esses animais não foram capazes de controlar a proliferação do parasito.

Subgrupos de macrófagos expressam níveis diferentes de citocinas dependendo da via de ativação e do microambiente. Macrófagos M2, por exemplo, expressam baixos níveis de mediadores inflamatórios, mas altos níveis de IL-10 e manose. Macrófagos M1 expressam altos níveis de TNF- $\alpha$  e enzimas envolvidas na geração de NO (MANTOVANI et al., 2005). Sabe-se que Treg produz IL-10 e essa produção tem papel crítico na manutenção intestinal de tolerância imune (RUBTSOV et al., 2008). Apesar de que IL-10 produzida por outros tipos de células também contribuem para a manutenção da homeostase intestinal, macrófagos CD11b<sup>+</sup> na lâmina própria são capazes de produzir IL-10 e estão envolvidos no equilíbrio da mucosa. Em outras palavras, IL-10 produzida pelas células reguladoras e por outras células tem função de controlar a homeostase imune intestinal. IL-10 pode ser produzida por vários tipos celulares incluindo macrófagos, dendríticas, linfócitos B e NK. A expressão aumentada de IL-10 está ligada à susceptibilidade à infecção com *L. major* (MILES et al., 2005) ao contrário do que se observou em nossos resultados. Em nosso caso, a expressão aumentada de IL-10 no jejuno está correlacionada à carga parasitária mais baixa. Pode ser que essa citocina esteja sendo secretada por outros tipos celulares e não somente por macrófagos e que apesar de IL-10 ser moduladora, está ativando resposta efetiva contra o parasito. Já foi relatado por Belkaid et al. (2005; 2006a e b) que o controle de uma resposta imune aguda contra *Leishmania* está localizada principalmente em órgãos linfóides e é independente de IL-10 enquanto o controle da resposta crônica requer acúmulo local de T reguladora e sua respectiva produção de IL-10 (BELKAID et al., 2002). Pelo que parece é o que acontece no cólon de cão com LV, onde há menor expressão de IL-10 e persistência do parasito.

## 9 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados desse estudo:

1. Não há correlação entre sinais clínicos e alterações anatomopatológicas, imunológicas e parasitológicas no trato gastrointestinal de cães com LV;
2. Não há correlação entre o estado clínico com expressão de receptores e citocinas, mas há associação tanto direta quanto inversa entre aspectos imunológicos e parasitológicos no trato gastrointestinal de cães com LV;
3. O segmento que apresentou menor carga parasitária, apresentou simultaneamente maior frequência e expressão de receptores como CD4, Foxp3, CD11b, TLR9, além de IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , ao passo que o segmento que apresentou maior carga parasitária apresentou concomitantemente maior expressão de CD14, TLR2, CD11c e IL-4;
4. A *Leishmania* influenciou, no jejuno, aumento da expressão de CD14, Manose, TLR9, CD11b, CD4, Foxp3 e redução da expressão de CD8; influenciou, no cólon, aumento da expressão de CD11c, CD14, Manose, TLR9, CD11b, CD4, Foxp3 e TLR2 e redução da expressão de CD8. Influenciou, nos linfonodos, aumento da expressão de CD4 e Foxp3 e redução da expressão de CD8.

## Considerações

Nossos achados apoiam e incentivam a continuidade dos estudos comparativos de receptores celulares da lâmina própria entre cães infectados com *L. infantum chagasi* e cães saudáveis. A padronização da técnica para isolar as células da lâmina própria de cão mostra que fomos capazes de determinar algumas propriedades fenotípicas de células intestinais, além de associar os achados ao estado clínico, à carga parasitária e à quantidade de células desses animais. Demonstramos um protocolo que pode ser útil para estudos de marcadores celulares gerais. A técnica aqui utilizada demonstrou que a presença de parasitos no intestino de cães infectados com *L. infantum chagasi* está correlacionada às alterações nos parâmetros imunológicos e na imunorregulação, uma vez que esses parasitos sobrevivem e se multiplicam no microambiente da mucosa intestinal e não parece danificar o hospedeiro.

A mucosa intestinal do jejuno e do cólon estava intacta apesar da presença de parasitos sugerindo que esses processos constitutivos de regulação ocorrem na mucosa intestinal para controlar os danos que poderiam resultar das respostas celulares contra os patógenos. É indispensável identificar os fatores que contribuem para a ativação e/ou regulação de TLR contra o parasito em cada um dos segmentos do TGI e avaliar o quanto a ativação de TLR, em cada uma dessas células, contribui para a patologia.

Nossas observações sugerem que a inflamação intestinal crônica em cães com LV não é simplesmente uma consequência da falta de Treg no local inflamado. Mostramos que na leishmaniose há envolvimento de maior expressão de Foxp3<sup>+</sup> na lâmina própria do jejuno. Na mucosa intestinal normal provavelmente há um mecanismo dependente de IL-10, e que Foxp3<sup>+</sup> é capazes de secretar IL-10. Foxp3<sup>+</sup> também foi encontrado no cólon sob condições fisiológicas normais, sugerindo uma ação local de Treg na homeostase intestinal.

Continua sem resposta o fato de que como o sistema imune intestinal, especialmente a colônica, mantém alta carga parasitária de *Leishmania* sem, contudo sofrer alterações histológicas. Estudos mais intensivos precisam ser realizados para responder a tantas questões.

## REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P. et al. [Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis]. *Acta Med Port [S.I.]*, v. 11, n. 10, p. 871-5, Oct 1998.
- ADAMAMA-MORAITOU, K. K. et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene [S.I.]*, v. 76, n. 1, p. 53-7, Jan 2007.
- ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean kala-azar. II — *Leishmania infantum*. *Proceedings of royal Society of London*, v. 108, p. 453-502, 1931.
- ALBUQUERQUE, A.R., et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. *Revista Clínica Veterinária*, v. 1, p. 78-80, 2007.
- ALEXANDER, J. et al. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science [S.I.]*, v. 112 Pt 18, p. 2993-3002, Sep 1999.
- ALONSO, M. J. et al. Duodenal leishmaniasis diagnosed by biopsy in two HIV-positive patients. *Pathology Research and Practice [S.I.]*, v. 193, n. 1, p. 43-7; discussion 49-50, 1997.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol [S.I.]*, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVES, C. F. et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology [S.I.]*, v. 128, n. 4, p. 349-358, Apr 15 2009.
- AMORIM, I. F. et al. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. *Plos One [S.I.]*, v. 6, n. 11, p. e27679, 2011.
- AMUSATEGUI, I. et al. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol [S.I.]*, v. 18, n. 2, p. 147-56, 2003.
- ANDERSON, D. C. et al. Endemic canine leishmaniasis. *Veterinary Pathology [S.I.]*, v. 17, n. 1, p. 94-6, Jan 1980.
- ANNACKER, O. et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *Journal of Experimental Medicine [S.I.]*, v. 202, n. 8, p. 1051-1061, Oct 17 2005.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol [S.I.]*, v. 30, n. 12-13, p. 1269-81, Nov 2000.
- ATARASHI, K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science [S.I.]*, v. 331, n. 6015, p. 337-41, Jan 21 2011.

- BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal [S.I.]*, v. 175, n. 1, p. 14-15, Jan 2008.
- BECKER, I. et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol [S.I.]*, v. 130, n. 2, p. 65-74, Aug 31 2003.
- BELKAID, Y. et al. Role for CD4+CD25+regulatory T cells in Leishmaniasis. *Faseb Journal [S.I.]*, v. 16, n. 5, p. A1070-A1071, Mar 22 2002.
- BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology [S.I.]*, v. 6, n. 4, p. 353-60, Apr 2005.
- BELKAID, Y. et al. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunological Reviews [S.I.]*, v. 212, p. 287-300, Aug 2006a.
- BELKAID, Y. et al. Parasites and immunoregulatory T cells. *Current Opinion in Immunology [S.I.]*, v. 18, n. 4, p. 406-12, Aug 2006b.
- BLACKWELL, J. M. Receptors and recognition mechanisms of Leishmania species. *Trans R Soc Trop Med Hyg [S.I.]*, v. 79, n. 5, p. 606-12, 1985.
- BONFANTI, U. et al. Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to Leishmania infantum, Ehrlichia canis, and Babesia canis. *Journal of Veterinary Internal Medicine [S.I.]*, v. 18, n. 5, p. 618-24, Sep-Oct 2004.
- BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol [S.I.]*, v. 56, n. 3-4, p. 345-51, May 1997.
- BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Veterinary Pathology [S.I.]*, v. 42, n. 2, p. 166-75, Mar 2005.
- BURGENER, I. A. et al. Upregulation of toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine [S.I.]*, v. 22, n. 3, p. 553-60, May-Jun 2008.
- CALIARI, M.V. Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes. Belo Horizonte: Editora UFMG, p. 149, 1997.
- CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 8, n. 5, p. 227-234, 1966.
- CAMARGO-NEVES, V. L. F. de et al. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, p. 145, 2006.
- CARRERA, L. et al. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *Journal of Experimental Medicine [S.I.]*, v. 183, n. 2, p. 515-26, Feb 1 1996.

CEZÁRIO, G. A. G. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 5, p. 573-583, 2011.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose visceral americana (relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da leishmaniose visceral americana em 1937). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 33, p.189-229, 1938.

CHANG, K. P.; FONG, D. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. *Ciba Found Symp [S.I.]*, v. 99, p. 113-37, 1983.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record [S.I.]*, v. 141, n. 21, p. 539-43, Nov 22 1997.

COOMBES, J. L.; MALOY, K. J. Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Seminars in Immunology [S.I.]*, v. 19, n. 2, p. 116-26, Apr 2007a.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine [S.I.]*, v. 204, n. 8, p. 1757-64, Aug 6 2007b.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Estudos sobre o parasito. In: *Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul*. *Mem Ins Oswaldo Cruz*, v. 32, p.329-337, 1937.

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

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity [S.I.]*, v. 30, n. 5, p. 626-35, May 2009.

DA COSTA-VAL, A. P. et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Veterinary Journal [S.I.]*, v. 174, n. 3, p. 636-43, Nov 2007.

DE VEER, M. J. et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *European Journal of Immunology [S.I.]*, v. 33, n. 10, p. 2822-31, Oct 2003.

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

DEANE, L. M. et al. [Control of *Phlebotomus longipalpis* by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceara]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop [S.I.]*, v. 7, n. 1, p. 131-41, Jan 1955.

DENVES, B.A. Leishmaniose: Histórico, etiologia, epidemiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle. *PubVet*, v. 2, n.13, 2008.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology* [S.I.], v. 14, n. 5, p. 417-23, Sep-Oct 1996.

DIAS, F. O. P. et al. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Caderno de Saúde Pública*, v. 19, p. 1373-80, 2003.

DONNELLAN, W. L. The structure of the colonic mucosa. The epithelium and subepithelial reticulohistiocytic complex. *Gastroenterology* [S.I.], v. 49, n. 5, p. 496-514, Nov 1965.

FANTRY, L. Gastrointestinal infections in the immunocompromised host. *Current Opinion in Gastroenterology* [S.I.], v. 18, n. 1, p. 34-39, Jan 2002.

FARIA, M. S. et al. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? *J Parasitol Res* [S.I.], v. 2012, p. 930257, 2012.

FAVA, F.; DANESE, S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol* [S.I.], v. 17, n. 5, p. 557-66, Feb 7 2011.

FERRER, L. [Canine leishmaniasis in Spain: data for the clinician]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [S.I.], v. 7, n. 6, p. 293-5, Jun-Jul 1989.

FERRER, L. et al. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Veterinary Pathology* [S.I.], v. 28, n. 4, p. 342-3, Jul 1991.

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Record* [S.I.], v. 136, n. 20, p. 514-6, May 20 1995.

FIGUEIREDO, M. M. et al. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Histology and Histopathology* [S.I.], v. 25, n. 7, p. 877-87, Jul 2010.

FIGUEIREDO, M. M. et al. Obtaining cells from colon of dog with leishmaniasis for flow cytometric analysis. 2011.

FLANDIN, J. F. et al. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *European Journal of Immunology* [S.I.], v. 36, n. 2, p. 411-20, Feb 2006.

FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor *Foxp3*. *Nature Immunology* [S.I.], v. 6, n. 4, p. 331-337, Apr 2005.

FREITAS, L. A. R. et al. A patologia intestinal no calazar: estudo morfológico de 31 fragmentos de mucosa jejunal, obtidas por biópsias de 20 crianças. *Ver Med Minas Gerais*, v. 5, n. 2, p. 17, 1995.

FURRIE, E. et al. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology [S.I.]*, v. 115, n. 4, p. 565-74, Aug 2005.

GAMBINERI, E. et al. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Current Opinion in Rheumatology [S.I.]*, v. 15, n. 4, p. 430-435, Jul 2003.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature Reviews Immunology [S.I.]*, v. 6, n. 12, p. 895-906, Dec 2006.

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

GONCALVES, R. et al. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infect Dis [S.I.]*, v. 5, p. 39, 2005.

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

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

GUITÉRREZ-MACÍAS, A. et al. Esophageal leishmaniasis in a patient infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*, v. 21, n. 1, p. 229-30, 1995.

GUNNLAUGSDOTTIR, B. et al. The ex vivo induction of human CD103<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Tregs is IL-2 and TGF-beta1 dependent. *Scand J Immunol [S.I.]*, Nov 6 2012.

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

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology [S.I.]*, v. 18, n. 8, p. 332-4, Aug 2002.

HAUSMANN, M. et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology [S.I.]*, v. 122, n. 7, p. 1987-2000, Jun 2002.

HAYASHI, T.; RAZ, E. TLR9-based immunotherapy for allergic disease. *American Journal of Medicine [S.I.]*, v. 119, n. 10, p. 897 e1-6, Oct 2006.

HERVAS, J. et al. Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). *Veterinary Record [S.I.]*, v. 139, n. 12, p. 293-5, Sep 21 1996.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet [S.I.]*, v. 354, n. 9185, p. 1191-9, Oct 2 1999.

HOLMGREN, J.; RUDIM, A. Mucosal immunity and bacteria. In ogra PL, Mestecky J, Lmm ME, Strober W. Mucosal Immunology. San Diego, Academy Press, p. 685-693, 1999.

ISHII, M. et al. Molecular cloning and tissue expression of canine Toll-like receptor 2 (TLR2). *Vet Immunol Immunopathol [S.I.]*, v. 110, n. 1-2, p. 87-95, Mar 15 2006.

ITOH, M. et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *Journal of Immunology [S.I.]*, v. 162, n. 9, p. 5317-26, May 1 1999.

IVANOV, II et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell [S.I.]*, v. 139, n. 3, p. 485-98, Oct 30 2009.

IWAKI, D. et al. The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry [S.I.]*, v. 277, n. 27, p. 24315-20, Jul 5 2002.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology [S.I.]*, v. 5, n. 10, p. 987-95, Oct 2004.

IZCUE A, E.; POWRIE, F. Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology*, v. 123, n. 1, p. 6-10, 2007.

IZCUE, A. et al. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annual Review of Immunology [S.I.]*, v. 27, p. 313-38, 2009.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology [S.I.]*, v. 20, p. 197-216, 2002.

JOHANSSON-LINDBOM, B. et al. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *Journal of Experimental Medicine [S.I.]*, v. 202, n. 8, p. 1063-73, Oct 17 2005.

KAVOOSI, G. et al. *Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in Toll-like receptor signaling. *Experimental Parasitology [S.I.]*, v. 124, n. 2, p. 214-8, Feb 2010.

KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Veterinary Pathology [S.I.]*, v. 21, n. 1, p. 80-6, Jan 1984a.

KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Veterinary Pathology [S.I.]*, v. 21, n. 1, p. 74-9, Jan 1984b.

KELLY, D. et al. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends in Immunology [S.I.]*, v. 26, n. 6, p. 326-33, Jun 2005.

KEMP, K. et al. Interferon-gamma production by human T cells and natural killer cells in vitro in response to antigens from the two intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishmania major*. *Scand J Immunol [S.I.]*, v. 46, n. 5, p. 495-9, Nov 1997.

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

KINIWA, Y. et al. CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Mediate Immunosuppression in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* v. 13, p. 6947-6958. December, 2007.

KRETSCHMER, K. et al. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature Immunology* [S.I.], v. 6, n. 12, p. 1219-1227, Dec 2005.

LAGUNA, F. et al. Prevalence of gastrointestinal leishmaniasis in Spanish HIV-positive patients with digestive symptoms. *American Journal of Gastroenterology* [S.I.], v. 89, n. 9, p. 1606, Sep 1994a.

LAGUNA, F. et al. Gastrointestinal leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients: report of five cases and review. *Clinical Infectious Diseases* [S.I.], v. 19, n. 1, p. 48-53, Jul 1994b.

LAGUNA, F. et al. [Gastrointestinal leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus]. *Revista Clinica Espanola* [S.I.], v. 194, n. 6, p. 510-1, Jun 1994c.

LAURENTI, M. D. et al. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. *International Journal of Experimental Pathology* [S.I.], v. 71, n. 6, p. 791-7, Dec 1990.

LE, D. T. et al. CD8<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes accumulate in the context of an effective anti-tumor response. *Int J Cancer.* v. 1, n.129, p. 636-47, Aug 201.

LEE, S. H. et al. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 161, n. 3, p. 475-89, Mar 1 1985.

LEMOS, E. M. et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Tropica* [S.I.], v. 107, n. 2, p. 205-7, Aug 2008.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* [S.I.], v. 32, p. 161-259, 1993.

LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica* [S.I.], v. 92, n. 1, p. 43-53, Sep 2004.

LIMA, W. G. et al. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* [S.I.], v. 117, n. 1-2, p. 129-36, May 15 2007.

LOCKSLEY, R. M.; LOUIS, J. A. Immunology of leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology* [S.I.], v. 4, n. 4, p. 413-8, Aug 1992.

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

LOWRY, O. H. Rosenbrough NJ, Randall RJ: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science [S.I.]*, v. 307, n. 5717, p. 1920-5, Mar 25 2005.

MACDONALD, T. T. et al. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology [S.I.]*, v. 140, n. 6, p. 1768-75, May 2011.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology [S.I.]*, v. 4, n. 6, p. 478-485, Jun 2004.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology [S.I.]*, v. 158, n. 4, p. 274-87, Dec 20 2008.

MAKITA, S. et al. CD4(+)CD25(bright) T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *Journal of Immunology [S.I.]*, v. 173, n. 5, p. 3119-3130, Sep 1 2004.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization comes of age. *Immunity [S.I.]*, v. 23, n. 4, p. 344-6, Oct 2005.

MARZOCHI, M. C. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz [S.I.]*, v. 80, n. 3, p. 349-57, Jul-Sep 1985.

MAURICIO, I. L. et al. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today [S.I.]*, v. 16, n. 5, p. 188-9, May 2000.

MAURYA, R. et al. Human visceral leishmaniasis is not associated with expansion or accumulation of Foxp3+ CD4 cells in blood or spleen. *Parasite Immunology [S.I.]*, v. 32, n. 7, p. 479-83, Jul 2010.

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity [S.I.]*, v. 31, n. 3, p. 389-400, Sep 18 2009.

MEDIAVILLA, G. J. D. et al. Esophago-gastric leishmaniasis in a patient with HIV infection. *Rev Clin Esp*, v. 191, n. 6, p. 335-6, 1992.

MILES, S. A. et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *Journal of Experimental Medicine [S.I.]*, v. 201, n. 5, p. 747-54, Mar 7 2005.

MIRO, G. et al. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology [S.I.]*, v. 24, n. 8, p. 371-7, Aug 2008.

MIRO, G. et al. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasit Vectors* [S.I.], v. 4, p. 52, 2011.

MORENO, J. et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* [S.I.], v. 71, n. 3-4, p. 181-95, Nov 30 1999.

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

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

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol* [S.I.], v. 4, n. 5, p. 315-22, Oct 1993.

MOURA EP: Avaliação histopatológica e imunológica de cães naturalmente infetados com *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas. 2007. 94f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MUIGAI, R. Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. *Lancet*, v. 27, p. 476-479, 1983.

MURRAY, H. W. et al. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 148, n. 6, p. 1858-63, Mar 15 1992.

NAGASHIMA, R. et al. Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [S.I.], v. 44, n. 7, p. 721-31, Jul 1996.

NATHAN, C. F. et al. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 158, n. 3, p. 670-89, Sep 1 1983.

NIETO, C. G. et al. Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* [S.I.], v. 44, n. 3-4, p. 175-82, Oct 1992.

NIETO, C. G. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* [S.I.], v. 67, n. 2, p. 117-30, Feb 1 1999.

NISHIO, J.; HONDA, K. Immunoregulation by the gut microbiota. *Cellular and Molecular Life Sciences* [S.I.], v. 69, n. 21, p. 3635-50, Nov 2012.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. *Waltham Focus*, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology* [S.I.], v. 16, n. 4, p. 213-32, Aug 2005.

ORTEGA-CAVA, C. F. et al. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 170, n. 8, p. 3977-85, Apr 15 2003.

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*. v. 5, n. 3 p. 232-9, may 2012.

PENA, M. T. et al. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol* [S.I.], v. 3, n. 1, p. 35-41, 2000.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunological Reviews* [S.I.], v. 213, p. 159-79, Oct 2006.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 62, n. 1, p. 229-35, Jan 1994.

PINELLI, E. et al. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 67, n. 1, p. 237-43, Jan 1999.

PINTO, A. J. et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand* [S.I.], v. 53, p. 67, 2011.

PLATT, A. M.; MOWAT, A. M. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett* [S.I.], v. 119, n. 1-2, p. 22-31, Aug 15 2008.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* [S.I.], v. 81, n. 1, p. 68-75, Aug 2006.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* [S.I.], v. 128, n. 1-3, p. 87-95, Mar 15 2009.

RIBEIRO RR: Biodistribuição, toxicidade e eficácia terapêutica da formulação de antimoniatto de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1903). 2007. 149f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RIBEIRO, R. R. et al. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* [S.I.], v. 52, n. 7, p. 2564-72, Jul 2008.

ROGLER, G.; ANDUS, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* [S.I.], v. 22, n. 4, p. 382-9, Apr 1998.

ROSENTHAL, P. J. et al. Rectal leishmaniasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *American Journal of Medicine* [S.I.], v. 84, n. 2, p. 307-9, Feb 1988.

ROSS, R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J*, v. 2, p. 1261-1401, 1903.

RUBTSOV, Y. P. et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* [S.I.], v. 28, n. 4, p. 546-58, Apr 2008.

RUGTVEIT, J. et al. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* [S.I.], v. 112, n. 5, p. 1493-505, May 1997.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology* [S.I.], v. 22, p. 531-62, 2004.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* [S.I.], v. 133, n. 5, p. 775-87, May 30 2008.

SALZMAN, N. H. et al. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in Immunology* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 70-83, Apr 2007.

SAMPAIO, W. M. et al. In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *BMC Vet Res* [S.I.], v. 3, p. 11, 2007.

SANDIG, H.; BULFONE-PAUS, S. TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Front Immunol* [S.I.], v. 3, p. 185, 2012.

SANTOS, F. R. et al. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet*, v. 90, p. 655-656, 1993.

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* [S.I.], v. 88, n. 1-2, p. 21-30, Sep 6 2002.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary Dermatology* [S.I.], v. 18, n. 4, p. 227-33, Aug 2007.

SCHLEICHER, U. et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 204, n. 4, p. 893-906, Apr 16 2007.

SERRANO, A. C. M. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba - SP - relato de caso. *Clinica Veterinária*, v. 76, p. 36-40, 2008.

SILVA FL: Estudo histopatológico e imuno-histoquímico do trato gastrointestinal de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2001. 41f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, F. L. et al. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: A case report. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia [S.I.]*, v. 54, n. 4, p. 340-344, Aug 2002.

SINGH, B. et al. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunological Reviews [S.I.]*, v. 182, p. 190-200, Aug 2001.

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

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology [S.I.]*, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, Jun 10 2000.

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

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology [S.I.]*, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, Oct 28 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors [S.I.]*, v. 4, p. 86, 2011.

SOLLIMA, S. et al. A case of oesophageal leishmaniasis indicating visceral leishmaniasis in a patient with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 18, n. 10, p. 752-5, 1999.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research [S.I.]*, v. 38, n. 4, p. 547-64, Jul-Aug 2007.

SUFFIA, I. J. et al. Infected site-restricted Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *Journal of Experimental Medicine [S.I.]*, v. 203, n. 3, p. 777-88, Mar 20 2006.

SUTMULLER, R. P. et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation [S.I.]*, v. 116, n. 2, p. 485-94, Feb 2006.

SUTMULLER, R. P. et al. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends in Immunology [S.I.]*, v. 27, n. 8, p. 387-93, Aug 2006.

- SUVAS, S. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 172, n. 7, p. 4123-32, Apr 1 2004.
- SWERDLOW, M. P. et al. Expression and function of TLR2, TLR4, and Nod2 in primary canine colonic epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* [S.I.], v. 114, n. 3-4, p. 313-9, Dec 15 2006.
- TAFURI, W. L. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [S.I.], v. 38, n. 2, p. 81-9, Mar-Apr 1996.
- TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology* [S.I.], v. 96, n. 3, p. 203-212, Apr 2 2001.
- TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods* [S.I.], v. 292, n. 1-2, p. 17-23, Sep 2004.
- TAKEDA, K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research* [S.I.], v. 11, n. 1, p. 51-5, 2005a.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* [S.I.], v. 17, n. 1, p. 1-14, Jan 2005b.
- TESTRO, A. G.; VISVANATHAN, K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* [S.I.], v. 24, n. 6, p. 943-54, Jun 2009.
- TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research* [S.I.], v. 109, n. 4, p. 1051-7, Oct 2011.
- TRIANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology* [S.I.], v. 23, n. 6, p. 301-4, Jun 2002.
- TRYPHONAS, L. et al. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Can J Comp Med* [S.I.], v. 41, n. 1, p. 1-12, Jan 1977.
- TUON, F. F. et al. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 76, n. 3, p. 866-72, Mar 2008.
- UHLIG, H. H. et al. Characterization of Foxp3<sup>(+)</sup>CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> and IL-10-secreting CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> T cells during cure of colitis. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 177, n. 9, p. 5852-5860, Nov 1 2006.
- VERCAMMEN, F. et al. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Tropica* [S.I.], v. 84, n. 3, p. 175-81, Dec 2002.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Editora Atheneu, v. 2, 1996.

VIDES, J. P. et al. Leishmania chagasi infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. Veterinary Parasitology [S.I.], v. 178, n. 1-2, p. 22-8, May 31 2011.

VILLANUEVA, J. L. et al. Leishmania esophagitis in an AIDS patient: an unusual form of visceral leishmaniasis. American Journal of Gastroenterology [S.I.], v. 89, n. 2, p. 273-5, Feb 1994.

VIVARINI, A. D. C. et al. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression. Of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. FASEB Journal, v. 25, n. 12, p. 4162-4173, 2011.

VOLLER, A. et al. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): guide with abstracts of microplate applications. Guerney: Dynatec Europe, v. 124, 1979.

WARBURG, A. et al. Scanning electron microscopy of Leishmania major in Phlebotomus papatasi. Z Parasitenkd [S.I.], v. 72, n. 4, p. 423-31, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. 2008. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/en\\_](http://www.who.int/leishmaniasis/en_)>. Acesso em: 28 jan. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. 2010. WHO Technical Report Series. P.201. Organization W H. Geneva: World Health Organization.

WOELBING, F. et al. Uptake of Leishmania major by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. Journal of Experimental Medicine [S.I.], v. 203, n. 1, p. 177-88, Jan 23 2006.

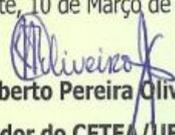
XAVIER, S. C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. BMC Vet Res [S.I.], v. 2, p. 17, 2006.

ZHANG, Y. W. et al. Molecular cloning and characterization of equine Toll-like receptor 9. Vet Immunol Immunopathol [S.I.], v. 124, n. 3-4, p. 209-19, Aug 15 2008.

ZHOU, L. et al. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. Immunity [S.I.], v. 30, n. 5, p. 646-55, May 2009.

## ANEXOS

## ANEXO 1 = Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA

 <p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b>  <b>COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</b>  <b>- C E T E A -</b></p>
<b>CERTIFICADO</b>
<p>Certificamos que o <b>Protocolo nº 257/2008</b>, relativo ao projeto intitulado "<i>Estudo histológico, imunológico e parasitológico do trato gastrintestinal de cães infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi</i>", que tem como responsável(is) <b>Wagner Luiz Tafuri</b>, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo <b>Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)</b>, tendo sido aprovado na reunião de <b>4/ 03/2009</b>.</p> <p>Este certificado expira-se em <b>4/ 03/ 2014</b>.</p>
<b>CERTIFICATE</b>
<p>We hereby certify that the <b>Protocol nº 257/2008</b>, related to the project entitled "<i>Histopathological, parasitological and immunohistochemical study of gastrointestinal tract of infected dogs with Leishmania (Leishmania) chagasi</i>", under the supervisors of <b>Wagner Luiz Tafuri</b>, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the <b>Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)</b>, and was approved in <b>March 4, 2009</b>.</p> <p>This certificate expires in <b>March 4, 2014</b>.</p>
<p>Belo Horizonte, 10 de Março de 2009.</p>  <p><b>Prof. Humberto Pereira Oliveira</b>  <b>Coordenador do CETEA/UFMG</b></p>
<p>Universidade Federal de Minas Gerais  Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  Unidade Administrativa II – 2º Andar, Saia 2005  31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>

**ANEXO 2A. Hematoxilina e Eosina**

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

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

**ANEXO 2B. Imuno-histoquímica (TAFURI et al., 2004)****Soluções:**

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

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

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

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

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

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

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

**Técnica:** Lâminas provenientes de blocos parafinados foram inicialmente desparafinadas em duas diferentes soluções de xilol por 15 minutos em cada; O bloqueio da peroxidase endógena foi feito adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 4%, 30 minutos a temperatura ambiente; Para o bloqueio das reações inespecíficas adicionou-se leite desnatado 6% e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente; Para formas amastigotas foi utilizado como anticorpo primário o soro de cão naturalmente infectado na diluição de 1:100 em quantidade suficiente para cobrir os fragmentos. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C; Adição

do anticorpo secundário e incubação em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente; Emprego da estreptoavidina-peroxidase e incubação por 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente; Revelação da peroxidase com a solução reveladora com peróxido de hidrogênio por cinco minutos a temperatura ambiente; Lavagem das lâminas em água corrente e contra-coloração com hematoxilina de Harris por três segundos; Banho de 10 minutos em água corrente; Desidratação nos álcoois crescentes (70% ao absoluto), diafanização em xilol e montagem com bálsamo Entelam<sup>TM</sup>; Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. O controle negativo foi feito utilizando PBS, no lugar de soro de cão infectado, na diluição de 10%. O controle positivo foi feito utilizando-se uma lâmina com corte histológico de órgãos de cães naturalmente infectados com alto parasitismo.

## **ANEXO 2C. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A extração do DNA das amostras dos fragmentos de pele incluídos em parafina foi realizada utilizando o “DNA ISOLATION KIT ®” (Gentra, EUA) seguindo instruções do fabricante com algumas modificações. Os fragmentos foram cortados em capela de fluxo laminar 72 previamente descontaminada pela ação da luz ultravioleta, com auxílio de uma lâmina de barbear inoxidável estéril – uma lâmina para cada bloco de parafina. Com um dos lados da lâmina foram retirados e descartados fragmentos da superfície do bloco a fim de evitar contaminações. Com o outro lado cortante da lâmina foram retirados fragmentos do material a ser utilizado para extração. Após a remoção do excesso de parafina com auxílio da lâmina de barbear, cerca de 10mg de tecido foram colocados em tubo de microcentrífuga de 1,5mL, onde foram triturados com pistilos de polietileno estéreis (Cienceware®, Bel-Art Products, EUA) moldados para os tubos. Os fragmentos triturados foram desparafinados com adição de 300µl de xilol (Merck, Alemanha) em cada tubo. As amostras foram então homogeneizadas por cinco minutos à temperatura ambiente, em movimentos constantes com auxílio de um homogeneizador automático (Lab Rotator®, Ames Co.,EUA). A seguir as amostras foram centrifugadas a 13.000g por três minutos, para descarte do xilol. Esse processo foi repetido por mais duas vezes, totalizando três banhos com xilol. As amostras foram submetidas a mais duas lavagens com 300µl de etanol 100% (Merck, Alemanha), em movimentos constantes, por cinco minutos. Seguiram-se centrifugação, a 13.000g por três minutos e descarte do etanol. Foi adicionado 300µl de solução de lise celular (DNA Isolation Kit®) em cada tubo com as amostras desparafinadas. Nessa etapa foram utilizados os pistilos para comprimir e homogeneizar os fragmentos no fundo do tubo fazendo-se 50 movimentos circulares, no sentido horário. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos, tratadas com adição de 1,5µl proteinase K (15mg/mL) (Sigma Aldrich, EUA) e homogeneizadas por inversão dos tubos. A seguir, foram incubadas a 55°C durante a noite e tratadas com 1,5µl RNase (4mg/mL) (Sigma Aldrich, EUA). Após a adição da RNase, os tubos foram homogeneizados por inversão e incubadas a 37°C por uma hora. À temperatura ambiente, as amostras foram tratadas com 100µl solução de precipitação de proteína (Kit DNA Puregene®). As amostras foram submetidas à homogeneização com auxílio de um aparelho vórtex para agitação (Certomat® MV, B. Braun, Alemanha) por 20 segundos e

centrifugação a 13.000g por três minutos. Em seguida o sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL contendo 300µl de isopropanol (Merck, Alemanha), homogeneizado cuidadosamente por inversão do tubo; centrifugado a 13.000g por cinco minutos; descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 300µl de etanol 70% (Merck, Alemanha) e centrifugou-se a 13.000g por um minuto, descartando cuidadosamente o sobrenadante. Após a secagem completa do tubo a temperatura ambiente, foi adicionado ao DNA extraído 20µl de solução de hidratação (Kit DNA Puregene®), sendo em seguida estocado a 4°C.

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

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

Para a amplificação, 15pmol de DNA foi adicionado a uma mistura contendo 15pmol de iniciador LV1; 15pmol de iniciador LV2; 7µl de “Go Taq® Green Master Mix”; 3,5µl de H<sub>2</sub>O deionizada “nuclease free” (Kit Go Taq® Green Master Mix, Promega, EUA). Em todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos. Os controles da reação para o material da biópsia de pele de orelha foram: DNA extraído de material de fragmento de pele de orelha emblocado em parafina de cão sabidamente portador de LV, DNA extraído de fragmento de pele de orelha emblocado em parafina de cão negativo para a doença. Para a reação, foram adicionados 1ng de DNA de *L.chagasi*, cepa MOHM/BR/1967/BH46, obtida em meio de cultura e um controle com todos os reagentes utilizados na reação exceto o DNA. A amplificação foi realizada a partir de um passo inicial de desnaturação por cinco minutos a 95°C; anelamento por 30 segundos a 59°C (ligação dos iniciadores); extensão a 72°C por trinta segundos e desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguidos por 33 ciclos iguais; a extensão final ocorreu a 72°C por dois minutos. Os componentes da reação estão representados no quadro abaixo.

Componentes	Quantidade
“Go Taq® Green Master Mix”*	7µL
Iniciadores LV1 e LV2	1,5µL de cada – 10pmol/µl
DNA extraído	1,5µl
H <sub>2</sub> O “nuclease free”* q.s.p.	15µL

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

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (Sigma Aldrich, EUA) não desnaturante em TBE (89mM TRIS-BORATO, 2mM EDTA, pH 8,0) por aproximadamente duas horas ou até que o corante xileno-cianol

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

## **ANEXO 2D. ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania***

A detecção de anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania*, nos soros obtidos, foram realizados pelo método de ELISA de acordo com a técnica descrita por VOLLER et al. (1979), com modificações: Os antígenos utilizados foram produzidos a partir de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* cepa MHOM/BR/1967/BH46. Essas foram centrifugadas a 250g (Hermle Z 323K, Alemanha), por dez minutos a 4°C, ressuspendidas em PBS e submetidas a ruptura por ultra-sonografia a 25ω por 45 segundos, cinco vezes (BRANSON 1510®, Branson Ultrasonics Co., EUA). A quantidade de proteína obtida foi dosada através do método de Lowry (LOWRY et al., 1951), sendo armazenada a -20°C em alíquotas até o momento do uso. Antes da implementação do ensaio imunoenzimático, nas amostras a serem testadas, realizou-se padronização do conjugado, uma vez que a concentração ideal de antígeno e diluição dos soros já estava padronizada. A diluição ótima do conjugado, anti-IgG-t-cão obtido a partir de soro imune de coelho (Sigma/USA - A6792), foi obtida por titulação em bloco, a partir de um “pool” de soros de cães parasitologicamente positivos para LV e um “pool de soros de cães negativos, provenientes de área não endêmica para LV.” Os soros foram diluídos 1/400, dispostos em triplicatas e o conjugado submetido a sucessivas diluições, iniciando-se 1/200 e terminando 1/204800. A partir dos resultados absolutos das absorbâncias, a 492nm, das triplicatas de cada diluição do conjugado obteve-se a média. Para cada diluição, foi calculada uma razão entre os valores de absorbância dos soros positivos e dos soros negativos. Assim, o título ideal foi escolhido como sendo o valor mais elevado, ou seja, quando houvesse distinção mais fidedigna entre soro positivo e soro negativo.

Foram utilizadas microplacas de polietileno (Falcon®, BD Lab., USA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício das microplacas foi sensibilizado com 2µg do antígeno diluídos em 100µL de tampão carbonato, seguindo-se um período de 24 horas para permitir que o antígeno se adsorvesse às paredes de cada orifício. Após a sensibilização, o excesso de

antígeno foi retirado através de lavagem da placa, por uma vez, com solução de lavagem. A solução para bloqueio de sítios inespecíficos foi adicionada, na ordem de 150µL por orifício, seguindo-se incubação por 30 minutos a 37°C. O excesso de solução tampão de bloqueio foi retirado por duas lavagens sucessivas. Os soros foram diluídos em tampão de incubação. Foi aplicado 100µL da solução diluída em cada orifício, sendo utilizada a diluição 1:400. Seguindo-se incubação por 45 minutos a 37°C e retirada do excesso do soro diluído por uma série de cinco lavagens. O conjugado foi diluído a seu título e 100µL dessa diluição foi acrescentada em cada orifício. Após nova incubação por 45 minutos a 37°C, o excesso de conjugado foi retirado por nova série de cinco lavagens. A solução do substrato foi então preparada e 100µL acrescentados em cada orifício. A reação ocorreu por 10 minutos a 37°C, quando foi interrompida pela adição de 25µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Merck, Alemanha) em cada orifício. Em qualquer etapa, após cada lavagem, as placas foram secas por inversão sobre papel absorvente. As leituras das reações foram realizadas em leitor de ELISA (BioRad. Modelo 550, Brasil) a 492nm. Os resultados expressos em valores de absorbância. Para cada placa o ponto de corte foi estabelecido a partir da média dos valores de absorbância dos soros dos cães de área não endêmica, adicionada de três vezes o desvio padrão. As soluções para a execução da técnica estão descritas a seguir:

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

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

- **Tampão Carbonato (Coating Buffer)**

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

Viável por 15 dias a 4°C

- **Solução de Lavagem**

NaCl (Merck)	9g
Tween 20 (Merck)	0,5mL
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1 litro

Manter a 4°C

- **Tampão de Bloqueio**

PBS pH 7,6 1000mL

Caseína (Sigma, Alemanha) 20g

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

- **Tampão de Incubação**

PBS pH 7,6 1000mL

Tween 20 0,5mL

Caseína (Sigma, Alemanha) 2,5g

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

Conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,19g ou 9,012g x 2 $\text{H}_2\text{O}$
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Ácido Cítrico) (Merck)	5,19g ou 5,7g x 2 $\text{H}_2\text{O}$
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	1 litro

- **Solução do Substrato**

Orto-phenyldamidina (Sigma® Aldrich, EUA)	10mg
$\text{H}_2\text{O}_2$ (30V)	4 $\mu\text{L}$
Tampão do Acido Cítrico	10mL

Preparar na hora do uso

- **$\text{H}_2\text{SO}_4$  4N**

$\text{H}_2\text{SO}_4$ (Merck)	concentrado 480mL
$\text{H}_2\text{O}$	q.s.p. 1000mL

## ANEXO 2E. ELISA para detecção de IL-4 em tecido

**Anticorpo de captura:** Canine IL-4, Mouse IgG1 cod#MAB 754 (R&D systems);

**Anticorpo de detecção:** Canine IL-4 Biotinylated Affinity purified polyclonal Ab, Goat IgG cod#BAF 754 (R&D systems);

**Padrão:** Recombinant canine IL-4 cod#754-CL-025 (R&D systems).

### Sensibilização da placa:

Anticorpo de captura na concentração de  $4\mu\text{g}/\text{mL}$ . Utilizamos  $80\mu\text{L}$  de anticorpo em  $10\text{mL}$  de PBS estéril (1x) para cada placa. Colocar  $100\mu\text{L}$  por poço e incubar overnight à temperatura ambiente.

### Procedimento:

1. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem ( $200\mu\text{L}$  de solução de lavagem, verter e secar bem);
2. Bloquear a placa: usar  $300\mu\text{L}$  de diluente, deixar à temperatura ambiente por 1h (no mínimo);
3. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem ( $200\mu\text{L}$  de solução de lavagem, verter e secar bem);
4. Preparar diluição seriada (2x) da curva padrão(recombinante) (serão utilizados  $100\mu\text{L}$  por poço):
  - Concentração máxima:  $20000\text{pg}/\text{mL}$
  - utilizar  $10\mu\text{L}$  para  $500\mu\text{L}$  diluente;
5. Adicionar o padrão, os brancos e as amostras e o nos respectivos poços ( $100\mu\text{L}/\text{poço}$ ) e deixar 2 h à temperatura ambiente;
6. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem ( $200\mu\text{L}$  de solução de lavagem, verter e secar bem).

### Anticorpo de detecção:

7. Adicionar a amostra e o anticorpo detecção nos poços respectivos (100µL/poço);  
- Utilizar na concentração de 0,2µg/mL (10ul anticorpo detecção para 10mL de diluente);
8. Colocar 100µL do anticorpo por poço, e deixar 1h à temperatura ambiente;
9. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem (200µL de solução de lavagem, verter e secar bem);
10. Adicionar 100µL de estreptoavidina na diluição 1:200, cobrir com papel alumínio e deixar 25 minutos à temperatura ambiente;
11. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem (200µL de solução de lavagem, verter e secar bem);
12. Adicionar 100µL de substrato, cobrir com papel alumínio por 20 minutos ou aguardar até reagir;  
-4mg de OPD em 10mL de tampão citrato e 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V. Preparar no momento de usar, ao abrigo da luz;
13. Adicionar 50µL de solução stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) por poço;
14. Leitura em 490nm.

A amostra de tecido intestinal (100mg) foi macerada em mixer automático (IKA Turrax® T10) em solução de extração. Para obter amostra de soro o sangue foi centrifugado a 3000rpm por 25 minutos a temperatura ambiente.

**Soluções:**

**Extração (15mL)** = Tris HCl 20mM – pH8 (300µL); NaCl 137mM (0,12g); NP40 1% Igepal (100 µL); Glicerol 10% (1,5mL); PMSF 1mM (15 µL); Pepstatina A 1 µM (15 µL); EDTA 10mM (300 µL); E-64 10mM (150 µL); Vanadato de Na 0,5mM (8 µL); H<sub>2</sub> qsq 15mL.

**PBS** (1x) estéril pH 7,4;

**Lavagem** = PBS 1x com 0,05% de Tween 20 pH 7,4;

**Diluente** = PBS 1x com 1% de BSA + 5% sacarose +0,05% azida sódica (NaN<sub>3</sub>) pH7,4;

**Substrato** = 4mg de OPD em 10mL de tampão citrato e 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V. Preparar no momento de usar, ao abrigo da luz;

**Stop** = 1mL de ácido sulfúrico PA em 1L de H<sub>2</sub>O destilada;

**Tampão Citrato** = 13,41g de fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O); 5,19g de ácido cítrico e dissolver em 1L de H<sub>2</sub>O destilada e acertar o pH para 5,0.

**ANEXO 2F. ELISA para detecção de IL-10**

**Anticorpo captura:** Canine IL-10. Mouse IgG1 cod#MAB 7352 (R&D systems);

**Anticorpo detecção:** Canine IL-10 Biotinykated Affinity purified polyclonal Ab, Goat IgG cod#BAF 735 (R&D systems);

**Padrão:** Recombinant canine IL-10 cod#735-CL-010 (R&D systems).

**Sensibilização da placa:**

1. Anticorpo de captura na concentração de 4µg/mL. Utilizamos 80µL de anticorpo em 10mL de PBS estéril (1x) para cada placa. Colocar 100µL por poço e incubar overnight à temperatura ambiente.

**Procedimento:**

2. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem (200 $\mu$ L de solução de lavagem, verter e secar bem);
3. Bloquear a placa: usar 300 $\mu$ L de diluente, deixar à temperatura ambiente por 1h (no mínimo);
4. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem (200 $\mu$ L de solução de lavagem, verter e secar bem);
5. Preparar diluição seriada (2x) da curva padrão (recombinante) (serão utilizados 100 $\mu$ L por poço):
  - Concentração máxima: 32000pg/mL
  - utilizar 16ul para 500ul diluente;
6. Adicionar o padrão, os brancos e as amostras e o nos respectivos poços (100 $\mu$ L/poço) e deixar 2 h à temperatura ambiente;
7. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem (200 $\mu$ L de solução de lavagem, verter e secar bem);

#### **Anticorpo de detecção:**

8. Adicionar a amostra e o anticorpo detecção nos poços respectivos (100 $\mu$ L/poço);
  - Utilizar na concentração de 0,1 $\mu$ g/mL
  - (2,5ul anticorpo detecção para 10mL de diluente)
9. Colocar 100 $\mu$ L do anticorpo por poço, e deixar 1h à temperatura ambiente;
10. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem (200 $\mu$ L de solução de lavagem, verter e secar bem);
11. Adicionar 100 $\mu$ L de estreptoavidina na diluição 1:200, cobrir com papel alumínio e deixar 25 minutos à temperatura ambiente;
12. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem (200 $\mu$ L de solução de lavagem, verter e secar bem);
13. Adicionar 100 $\mu$ L de substrato, cobrir com papel alumínio por 20 minutos ou aguardar até reagir; -4mg de OPD em 10mL de tampão citrato e 2 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V. Preparar no momento de usar, ao abrigo da luz;
14. Adicionar 50 $\mu$ L de solução stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) por poço;
15. Leitura em 490nm.

A amostra de tecido intestinal (300mg) foi macerada em mixer automático (IKA Turrax® T10) em solução de extração. Para obter amostra de soro o sangue foi centrifugado a 3000rpm por 25 minutos a temperatura ambiente.

#### **Soluções:**

**Extração (15mL)** = Tris HCl 20mM – pH8 (300 $\mu$ L); NaCl 137mM (0,12g); NP40 1% Igepal (100  $\mu$ L); Glicerol 10% (1,5mL); PMSF 1mM (15  $\mu$ L); Pepstatina A 1  $\mu$ M (15  $\mu$ L); EDTA 10mM (300  $\mu$ L); E-64 10mM (150  $\mu$ L); Vanadato de Na 0,5mM (8  $\mu$ L); H<sub>2</sub> qsq 15mL.

**PBS** (1x) estéril pH 7,4;

**Lavagem** = PBS 1x com 0,05% de Tween 20 pH 7,4;

**Diluente** = PBS 1x com 1% de BSA + 5% sacarose +0,05% azida sódica(NaN<sub>3</sub>) pH7,4;

**Substrato** = 4mg de OPD em 10mL de tampão citrato e 2 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V. Preparar no momento de usar, ao abrigo da luz;

**Stop** = 1mL de ácido sulfúrico PA em 1L de H<sub>2</sub>O destilada;

**Tampão Citrato** = 13,41g de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ); 5,19g de ácido cítrico e dissolver em 1L de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e acertar o pH para 5,0.

## **ANEXO 2G. ELISA para detecção de TNF- $\alpha$**

**Anticorpo captura:** Anticorpo monoclonal anti-TNF alfa canino cod#MAB 1507 (R&D systems);

**Anticorpo detecção:** Anticorpo biotilado anti-TNF alfa canino cod#BAF 1507 (R&D systems)

**Padrão:** TNF-alfa canino recombinante cod#1507-CT-025 (R&D systems)

Sensibilização da placa:

1. A anticorpo de captura na concentração de  $4\mu\text{g/mL}$ . Utilizamos  $80\mu\text{L}$  de anticorpo em  $10\text{mL}$  de PBS estéril (1x) para cada placa. Colocar  $100\mu\text{L}$  por poço e incubar overnight à temperatura ambiente.

Procedimento:

2. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem ( $200\mu\text{L}$  de solução de lavagem, verter e secar bem);
3. Bloquear a placa: usar  $300\mu\text{L}$  de diluente, deixar à temperatura ambiente por 1h (no mínimo);
4. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem ( $200\mu\text{L}$  de solução de lavagem, verter e secar bem);
5. Preparar diluição seriada (2x) da curva padrão(recombinante) (serão utilizados  $100\mu\text{L}$  por poço):
  - Concentração máxima:  $1000\text{pg/mL}$
  - utilizar  $0,5\mu\text{L}$  para  $5000\text{mL}$  diluente;
6. Adicionar o padrão, os brancos e as amostras e o nos respectivos poços ( $100\mu\text{L}/\text{poço}$ ) e deixar 2 h à temperatura ambiente;
7. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem ( $200\mu\text{L}$  de solução de lavagem, verter e secar bem);

Anticorpo de detecção:

8. Adicionar a amostra e o anticorpo detecção nos poços respectivos ( $100\mu\text{L}/\text{poço}$ );
  - Utilizar na concentração de  $0,1\mu\text{g/mL}$
  - ( $20\mu\text{L}$  anticorpo detecção para  $10\text{mL}$  de diluente)
9. Colocar  $100\mu\text{L}$  do anticorpo por poço, e deixar 1h à temperatura ambiente;
10. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem ( $200\mu\text{L}$  de solução de lavagem, verter e secar bem);
11. Adicionar  $100\mu\text{L}$  de estreptoavidina na diluição 1:200, cobrir com papel alumínio e deixar 25 minutos à temperatura ambiente;
12. Lavar a placa 3 vezes com tampão de lavagem ( $200\mu\text{L}$  de solução de lavagem, verter e secar bem);
13. Adicionar  $100\mu\text{L}$  de substrato, cobrir com papel alumínio por 20 minutos ou aguardar até reagir;

-4mg de OPD em 10mL de tampão citrato e 2 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V. Preparar no momento de usar, ao abrigo da luz;

14. Adicionar 50 $\mu$ L de solução stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) por poço;

15. Leitura em 490nm.

A amostra de tecido intestinal (100mg) foi macerada em mixer automático (IKA Turrax® T10) em solução de extração. Para obter amostra de soro o sangue foi centrifugado a 3000rpm por 25 minutos a temperatura ambiente.

#### **Soluções:**

**Extração (15mL)** = Tris HCl 20mM – pH8 (300 $\mu$ L); NaCl 137mM (0,12g); NP40 1% Igepal (100  $\mu$ L); Glicerol 10% (1,5mL); PMSF 1mM (15  $\mu$ L); Pepstatina A 1  $\mu$ M (15  $\mu$ L); EDTA 10mM (300  $\mu$ L); E-64 10mM (150  $\mu$ L); Vanadato de Na 0,5mM (8  $\mu$ L); H<sub>2</sub> qsq 15mL.

**PBS (1x)** estéril pH 7,4;

**Lavagem** = PBS 1x com 0,05% de Tween 20 pH 7,4;

**Diluente** = PBS 1x com 1% de BSA pH7,4;

**Substrato** = 4mg de OPD em 10mL de tampão citrato e 2 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V. Preparar no momento de usar, ao abrigo da luz;

**Stop** = 1mL de ácido sulfúrico PA em 1L de H<sub>2</sub>O destilada;

**Tampão Citrato** = 13,41g de fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O); 5,19g de ácido cítrico e dissolver em 1L de H<sub>2</sub>O destilada e acertar o pH para 5,0.

#### **ANEXO 2H. ELISA para detecção de IFN-**

Idem anexo G

#### **ANEXO 2I. ELISA para detecção de TGF-**

Idem anexo G

#### **ANEXO 3J. Reação de imonofluorescência indireta (RIFI)**

Os soros obtidos dos cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum chagasi* foram submetidos à Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos IgG segundo a técnica descrita por Camargo (1966), com as seguintes modificações: para a obtenção do título desejado, os soros a serem testados foram diluídos na razão de um para dois, a partir de 1:40, em PBS. Foram colocados 25 $\mu$ L da solução obtida sobre cada região demarcada de uma lâmina, na qual foi previamente fixado o antígeno, constituído por formas íntegras de promastigotas de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1967/BH46. Após a incubação das lâminas em câmara úmida, por 30 minutos em estufa a 37°C, essas foram lavadas com PBS, cobertas com o mesmo por cinco minutos, lavadas em água destilada e secas sob ventilação artificial (Ventilador Britânia B20, Brasil). Posteriormente, em cada região demarcada da lâmina foram acrescentados 25 $\mu$ L do conjugado, diluído a seu título, em azul de Evans (EVANS BLUE®, Sigma Aldrich, EUA) a 1/5000, sendo esse previamente preparado em PBS Tween (Tween® 80, Merck, Alemanha) a 2%. O conjugado utilizado (Bethyl Lab. Inc., EUA), marcado com Isotiocianato de Fluoresceína, foi específico anti-IgG de cão. Seguiram-se nova incubação, lavagem e secagem. A lâmina foi, então, coberta com glicerina tamponada e lamínula e a leitura procedida em microscópio de luz ultravioleta

(Olympus BX 41<sup>®</sup>, Japão). Soros sabidamente positivos e negativos foram usados na mesma lâmina como controle da reação.

### Soluções para realização da RIFI

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

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Alemanha)	1,20g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O (Merck, Alemanha)	0,22g
NaCl (Merck, Alemanha)	8,5g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p. 1000mL

- **Solução de Azul de Evans 1:100**

Azul de Evans (Sigma)	0,1g	0,05g	0,025g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	10,0mL	5,0mL	2,5mL
Azul de Evans	50μL		
PBS - Tween 80 a 2%	2950μL		

- **Glicerina tamponada**

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

Salina Tamponada (especial)

#### Solução 1

0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O 0,268g / ou .2 H<sub>2</sub>O 0,178g

#### Solução 2

0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 0,138g

Em 10 mL de água destilada

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

### ANEXO 2K. Giemsa

Realizar o esfregaço em lâmina e após seco submergi-lo no álcool metílico para fixação por 3 minutos e deixar secar a temperatura ambiente. Diluir 3 gotas de corante de Giemsa para 2 gotas da solução tampão; corar com o Giemsa diluído por 15 a 30 minutos, em uma cuba ou sobre a própria lâmina; desprezar o corante e lavar em água destilada até que a preparação atinja uma coloração de tom rósea; deixar secar em posição inclinada.

### ANEXO 2L. Obtenção das células da lâmina própria intestinal

1. Remover um fragmento de 1cm de jejuno e 1cm de cólon.
2. Lavar minuciosamente, com ajuda de uma pinça, com meio incompleto em uma placa de petri para retirar os resíduos e fezes.
3. Transferir o fragmento para uma placa de petri com 10mL de meio completo no gelo.
4. Retirar a gordura (muito importante).
5. Cortar o fragmento com uma tesoura e pinça em pedacinhos muito pequenos (o máximo que conseguir).
6. Colocar essa placa no shaker (agitação lenta) por 10 minutos.
7. Descartar lentamente o meio e acrescentar mais 10mL de meio completo e colocar no shaker por mais 10 minutos. Esse procedimento foi feito 6 vezes.
8. Na sexta vez descartar o meio e colocar os fragmentos numa garrafa de cultura pequena com 10 mL de solução de incubação (DTT) em shaker 37°C por 30 minutos. (DL-Dithiothreitol Sigma D-0632, 5g)
9. Descartar a solução de incubação, acrescentar mais 10mL de solução de incubação (DTT) em shaker 37°C por 30 minutos.
10. Descartar a solução de incubação, acrescentar 10mL de solução de lavagem HBSS/HEPES por 10 minutos sob agitação lenta para lavar o DTT.
11. Acrescentar 10mL de solução com colagenase por uma hora no shaker 37°C. (Collagenase from *Clostridium histolyticum* Tipe II, 906 units/MG CAS 9001-12-1, C6885-500mg, 078K8621).
12. Retirar depois de uma hora o sobrenadante e reservá-lo rapidamente em um tubo de 15mL no gelo.
13. Acrescentar 10mL de solução com colagenase por uma hora no shaker 37°C.
14. Centrifugar o sobrenadante por 10 minutos a 4°C, 1400 rpm. Ressuspender em 0,5µL de meio completo e reservar no gelo.
15. Retirar depois de uma hora o sobrenadante e reservá-lo rapidamente em um tubo de 15mL no gelo.
16. Acrescentar 10mL de solução com colagenase por uma hora no shaker 37°C.
17. Centrifugar o sobrenadante por 10 minutos a 4°C, 1400 rpm. Ressuspender em 0,5µL de meio completo e reservar no gelo.
18. Retirar depois de uma hora o sobrenadante e reservá-lo rapidamente em um tubo de 15mL no gelo.
19. Acrescentar 10mL de solução com colagenase por uma hora no shaker 37°C.
20. Centrifugar o sobrenadante por 10 minutos a 4°C, 1400 rpm. Ressuspender em 0,5µL de meio completo e reservar no gelo.
21. Retirar o sobrenadante e reservá-lo rapidamente em um tubo de 15mL no gelo.
22. Centrifugar o sobrenadante por 10 minutos a 4°C, 1400 rpm. Ressuspender em 0,5µL de meio completo e reservar no gelo.
23. Juntar todas as células centrifugadas e ressuspensas em um único tubo (aproximadamente 2mL).
24. Passar essa suspensão em uma peneirinha em tubo de 50mL.
25. Acrescentar 9mL de água destilada e rapidamente 1mL de PBS 10X, para lisar as hemácias.

26. Centrifugar novamente por 10 minutos, a 4°C 1400rpm e ressuspender em 0,5µL de meio completo
27. Contar as células em câmara de newbauer.
28. Bloquear as células com 5% de soro de cão negativo. Deixar pelo menos 20 minutos no gelo.
29. Plaquear as células (20µL/well).
30. Plaquear os anticorpos que podem ser diluídos no dia anterior e guardados sob abrigo da luz em geladeira. Lembrar que os anticorpos intracitoplasmáticos (FoxP3 e TLR9) devem ser diluídos em tampão permeabilizante.
31. Deixar 15 minutos na geladeira.
32. Acrescentar 150µL de PBS gelado em cada well.
33. Centrifugar a placa por 10 minutos a 4°C, 1300rpm por 10 minutos.
34. Flicar. Passar no vórtex.
35. Acrescentar 200µL de formaldeído a 2%.
36. Os wells de marcação de superfície podem ser transferidos para os tubos de facs e guardados na geladeiras ao abrigo da luz.
37. Os de marcação intracitoplasmática devem ficar 20 minutos com formaldeído. Em seguida, centrifuga por 10 minutos a 1300 a 4 °C, ressuspende com 200µL de wash B e deixa na placa.
38. Se for continuar no dia seguinte, guardar na geladeira ao abrigo da luz, e segue o protocolo de marcação intracitoplasmática.
39. Se for continuar no mesmo dia segue o protocolo para marcação intracitoplasmática.

## **ANEXO 2M. Obtenção das células de linfonodos**

1. Coletar os linfonodos cervical e mesentérico, retirar a cápsula e colocá-los em 2mL meio completo em tubo de 15mL.
2. Macerar em macerador até obter uma massa homogênea.
3. Centrifugar 1200 rpm por 10 minutos a 4°C.
4. Descartar o sobrenadante, colocar 9mL de água destilada e 1mL de PBS 10X (deve ser muito rápido).
5. Centrifugar por 10 minutos 1200 rpm a 4°C.
6. Descartar o sobrenadante, colocar 9mL de água destilada e 1mL de PBS 10X (deve ser muito rápido).
7. Filtrar em peneirinha, no tubo de 50mL.
8. Centrifugar por 10 minutos 1200 rpm a 4°C.
9. Descartar o sobrenadante, ressuspender em 1mL de meio completo. Manter no gelo.
10. Contar as células em câmara de newbauer.
11. Bloquear as células com 5% de soro de cão negativo. Deixar pelo menos 20 minutos no gelo.
12. Plaquear as células (20µL/well).

13. Plaquear os anticorpos que podem ser diluídos no dia anterior e guardados sob abrigo da luz em geladeira. Lembrar que os anticorpos intracitoplasmáticos (FoxP3 e TLR9) devem ser diluídos em tampão permeabilizante.
14. Deixar 15 minutos na geladeira.
15. Acrescentar 150 $\mu$ L de PBS gelado em cada well.
16. Centrifugar a placa por 10 minutos a 4°C, 1300rpm por 10 minutos.
17. Flicar. Passar no vórtex.
18. Acrescentar 200 $\mu$ L de formaldeído a 2%.
19. Os wells de marcação de superfície podem ser transferidos para os tubos de facs e guardados na geladeiras ao abrigo da luz.
20. Os de marcação intracitoplasmática devem ficar 20 minutos com formaldeído. Em seguida, centrifuga por 10 minutos a 1300 a 4 °C, ressuspende com 200 $\mu$ L de wash B e deixa na placa.
21. Se for continuar no dia seguinte, guardar na geladeira ao abrigo da luz, e segue o protocolo de marcação intracitoplasmática.
22. Se for continuar no mesmo dia segue o protocolo para marcação intracitoplasmática.

## **ANEXO 2N. Marcação intra-citoplasmática em células da lâmina própria**

1. Centrifugar por 10 minutos, 1300 rpm a 4°C.
2. Flicar. Vórtex.
3. Acrescentar 150 $\mu$ L de Wash B.
4. Centrifugar 4°C, 1300rpm por 10 minutos.
5. Flicar. Vórtex.
6. Acrescentar 150 $\mu$ L de tampão permeabilizante.
7. Misturar lentamente e reservar por 10 minutos temperatura ambiente.
8. Centrifugar 10 minutos, 4°C, 1300rpm.
9. Flicar. Vórtex.
10. Adicionar os anticorpos intracitoplasmáticos (inclusive os isotipos) diluídos em tampão permeabilizante.
11. Incubar por 40 minutos a temperatura ambiente.
12. Acrescentar 150 $\mu$ L de tampão permeabilizante.
13. Centrifugar 4°C, 1300rpm por 10 minutos.
14. Flicar. Vórtex.
15. Acrescentar 150 $\mu$ L de tampão permeabilizante.
16. Centrifugar a 4°C, 1300rpm por 10 minutos.
17. Flicar. Vórtex.
18. Ressuspender em 150 $\mu$ L de wash B.
19. Centrifugar a 4°C, 1300rpm por 10 minutos.
20. Flicar. Vórtex.
21. Ressuspender 200 $\mu$ L de formaldeído 2%.
22. Transferir para tubos de FACS e guardar em geladeira ao abrigo da luz por no máximo 1 dia.

## ANEXO 20. Soluções utilizadas - FACS

**Wash A:** PBS 1X (90mL de água destilada e 10mL de PBS concentrado).

**Wash B:** PBS 1X, 0.5% de BSA, 2mM de azida  
Para 125mL de solução

12,5mL	PBS 10X, pH 7.4
112,5mL	H <sub>2</sub> O (destilada)
125µL	Azida 1Mm
0,625g	BSA

OBS. Não homogeneizar! Deixar o BSA dissolver completamente sozinho.

### Saponina 10%

Para 5mL de solução

0,5g	Saponina (Sigma #S-7900)
5mL	PBS 1X, pH 7.4

1. Deixar a 37°C até a saponina dissolver completamente;
2. Filtrar a solução em filtro 0.22 µm; Estocar a solução a 4°C.

### Formaldeído 2%

Para 50mL de solução

5mL	PBS 10X
2,7mL	Formaldeído 37.5%
39,6mL	H <sub>2</sub> O (destilada)

1. Esterilizar em filtro para remover qualquer partícula;
2. Estocar a 4°C.

**ADS: Antibody Dilution Solution** (Solução de diluição de Anticorpos):  
50% de Wash B + 50% de PBS 1X

**Permeabilization Buffer:** Wash B + Saponina

5mL	Saponina 10%
95mL	Wash B