

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

ANÁLISE IMUNOLÓGICA E ANÁTOMO-PATOLÓGICA DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) chagasi*
TRATADOS COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO
EM LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS E ALOPURINOL

IZABELA FERREIRA GONTIJO DE AMORIM

Belo Horizonte
Fevereiro de 2012

IZABELA FERREIRA GONTIJO DE AMORIM

ANÁLISE IMUNOLÓGICA E ANÁTOMO-PATOLÓGICA DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) chagasi*
TRATADOS COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO EM
LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS E ALOPURINOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Wagner Luiz Tafuri - UFMG

Co-orientador (a): Prof^a Marilene Suzan Marques
Michalick - UFMG

Belo Horizonte
Fevereiro de 2012

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de agradecer ao programa de Pós Graduação em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade, apoio e incentivo fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Primeiramente, devo agradecer a Deus por todas as coisas maravilhosas que me foram concedidas. A cada momento que passo, a cada pessoa que conheço, por amar e sonhar, por cada dia, agradeço por tudo!!!

Aos meus pais José Gontijo e Maria Marta que me deram a vida, educação, suas vivências que construíram meu caráter, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Agradeço aos valores morais de respeito ao próximo, gratidão e fé que recebi. Valorizo cada gesto de amor que me foi dedicado. Sou muito grata por tudo!

Á minha querida irmã e amiga Natale por sempre torcer por mim e ser um grande exemplo de competência, determinação e disciplina. Ao Charles pelo amor, incentivo e amizade.

Ao Fábio pelo amor e companheirismo irrepreensível.

A todos meus tios e tias, primos e primas que me incentivaram e torceram por mim.

Ao meu orientador e professor Dr. Wagner Tafuri, que sempre demonstrou acreditar em meu potencial. Agradeço pela oportunidade oferecida, pela orientação, amizade, apoio e, principalmente, bom convívio nestes quatro anos de trabalho. Com ele tive a oportunidade de enriquecer meus conhecimentos através de suas argumentações científicas e vivências profissionais

Á minha co-orientadora Dra Marilene Suzan Marques Michalick pelos ensinamentos compartilhados e incentivo, desde a época do mestrado.

A Maria Norma Melo pelas valiosas conversas e sugestões, ensinamentos e apoio.

Aos meus queridos amigos-irmãos: Lucélia Pinheiro, Lucélia Coimbra, Aldair Woyames, Rodrigo Soares e César Augusto Vilela pela amizade e companheirismo. Levo vocês no meu coração!!!!

Gostaria de agradecer de coração meus colegas de trabalho do laboratório de Patologia das Leishmanioses: Carolina de Souza, Daniel, Igor Madeira, Maria Marta Figueiredo e Vítor Barbosa pela alegre convivência e sugestões essenciais no desenvolvimento deste trabalho. Todos os momentos de descontração foram fundamentais para que as minhas forças fossem restabelecidas. A vocês muito obrigada!

Aos meus pupilos, Jaqueline, Aline e Marcela, que tanto contribuíram na execução deste trabalho e com as quais creio que ter contribuído em suas iniciações científicas. Pela ajuda, amizade e pela cooperação nessa etapa final, meu reconhecimento e meu muito obrigado.

Ao meu companheiro de doutorado e mestrado Sydnei Magno da Silva pela valiosa convivência. Exemplo de competência. Obrigada por me ajudar em todos os momentos.

Um agradecimento especial para Vânia Aparecida do Nascimento Silva e Olinda Disidéria Rodrigues, excelentes profissionais, que sempre me auxiliaram nos experimentos. Muito obrigada pela enorme ajuda e amizade. Amo vocês!!!!

Ao Eder e Elmo e demais funcionários do ICB, que forneceram condições estruturais adequadas para o desenvolvimento dos trabalhos, pelo seu ótimo humor e profissionalismo.

Aos Cães que tornaram possível a criação de inúmeros conhecimentos na área da patologia veterinária e por doarem suas vidas em contribuição ao experimento.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão das Neves que possibilitou o acesso aos cães infectados estudados no trabalho. Agradeço especialmente ao médico veterinário Márcio.

Aos membros da banca: Profa. Dra. Silvana Eloy, Prof. Dr Ricardo Toshio Fujiwara, Prof. Dr. Luiz Crocco, Profa. Dra. Márcia Dalastra, Prof. Dr. Ricardo Gonçalves, Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima e Profa. Dra. Claudia Gomes; por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer aos financiadores deste projeto, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro que possibilitou desenvolver meu trabalho.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

Cada um uma história, um agradecimento em particular;

a cada um, tanto a dizer.....e também sei que cada um sabe sua importância ímpar nessa história.

Muito obrigada!!!

No caminho com Maiakovski

“ (...) Tu sabes, conheces melhor do que eu a velha história.

Na primeira noite eles se aproximam e roubam uma flor do nosso jardim.

E não dizemos nada.

Na segunda noite, já não se escondem:

pisam as flores, matam nosso cão.

E não dizemos nada.

Até que um dia, o mais frágil deles entra sozinho em nossa casa, rouba-nos a luz, e, conhecendo nosso medo, arranca-nos a voz da garganta.

E já não podemos dizer nada”.

Eduardo Alves da Costa

"Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo.

Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo.

Não viva de fotografias amareladas.

Continue, quando todos esperam que desistas.

Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.

Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você.

Quando não conseguir correr através dos anos, trote.

Quando não conseguir trotar, caminhe.

Quando não conseguir caminhar, use uma bengala.

Mas, nunca se detenha".

Madre Teresa de Calcutá

Resumo

As leishmanioses constituem um complexo de enfermidades que atingem o homem, causadas por protozoários flagelados intracelulares obrigatórios que residem predominantemente em células do sistema mononuclear fagocitário dos hospedeiros vertebrados. Nas Américas, os cães (*Canis Lupus familiares*) são considerados os principais reservatórios domésticos para a leishmaniose visceral (LV) humana. No Brasil, as medidas preconizadas, referentes ao controle da LV, consideram o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos; aspersão de inseticidas residuais, para combate do inseto vetor, e inquérito sorológico dos cães, com posterior eutanásia daqueles soropositivos. Entretanto, a eliminação dos cães, por muitos, não é aceita por questões econômicas, sociais e éticas. O tratamento do cão infectado, com a terapêutica convencional é discutível, assim, a utilização de formulações lipossomais carreando fármacos com ação leishmanicida constitui uma estratégia promissora. Somado a isso, o co-tratamento com fármacos com ação leishmanioestática constituem uma boa estratégia no tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC). Dessa forma, nesse estudo, foram utilizados quarenta e seis cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, classificados como sintomáticos. Esses foram alocados, aleatoriamente, em seis grupos experimentais: grupo antimonial de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (Ant); grupo lipossomo vazio (LipV); grupo antimonial de meglumina encapsulado em lipossoma associado ao alopurinol (Ant+Alo); grupo lipossoma vazio associado ao alopurinol (LipV+Alo); grupo alopurinol (Alo) e controle (C), sendo esse último mantido como controle da infecção. O protocolo terapêutico preconizado consistiu em seis administrações, a cada 96h, por via endovenosa, de 6,5mg/Kg de antimonial de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos; seis

administrações, a cada 96h, por via endovenosa, em volume correspondente de lipossomas nominados vazios; sendo que, metade dos cães, de cada um dos grupos supracitados, receberam conjuntamente 20mg/Kg de alopurinol, uma vez ao dia, por um período de 140 dias. Outro grupo recebeu apenas o alopurinol, por um período similar ao anterior. Avaliações clínicas foram realizadas antes do início do tratamento, nominado tempo (T0) e nos momentos correspondentes a 50, 80, 110, 140, 170 e 201 dias após o início do tratamento (T50, T80, T110, T140, T170 e T201). De forma semelhante, amostras de sangue periférico foram coletadas no momento T0, T60, T140 e T200. Procedeu-se à imunomarcagem das células mononucleares do sangue periférico com anticorpos anti-CD11b, anti-MHCII, anti-TL-2, anti-CD4 e anti-CD8 avaliados pela técnica de citometria de fluxo. Biópsias de pele, da face interna da pata direita, foram coletadas nos momentos T0, T60, T140. No T201 amostras de pele, fígado, baço e linfonodo cervical superficial foram coletadas durante a avaliação necrótica e processadas para avaliações histológicas rotineiras. Estudos semi-quantitativos das alterações histológicas e qualitativas do parasitismo tecidual (imuno-histoquímica) foram realizados utilizando-se microscopia óptica convencional.

O tratamento envolvendo o alopurinol (Alo) principalmente associado ao antimonial pentavalente encapsulado com lipossomas manométricos (Ant+Alo) promoveu significativa redução do parasitismo tecidual (pele, fígado e baço) e melhora clínica de todos os animais. Entretanto, apesar dessa melhora não houve modulação da resposta imune do tipo celular (frequência da população linfocitária CD4/CD8) nos cães estudados. Além disso, a expressão de CR3 e TLR-2 nos monócitos CD14⁺, apesar das variações observadas ao longo da cinética dos diferentes protocolos de tratamento, não apresentaram correlação com o quadro clínico. Esses mesmos grupos (Alo e Ant+Alo) mostraram remissão dos sinais dermatológicos clássicos da LVC; além de diminuição das

alterações histológicas na pele caracterizada principalmente pela menor frequência de dermatite crônica. Quando comparado ao grupo LipV, esses grupos apresentaram peso relativo do fígado significativamente inferior. Cães tratados com alopurinol, com as diversas associações, e cães tratados com antimoniato de meglumina encapsulado com lipossomos manométricos, quando comparados ao grupo de cães tratados com lipossomas vazios, apresentaram diminuição no número de granulomas intralobulares hepáticos caracterizando uma resolução da hepatite crônica. Cães do grupo Ant+Alo apresentaram peso relativo do baço significativamente menor em relação ao grupo Alo e C. O tratamento nas diferentes condições experimentais não interferiu significativamente nas lesões esplênicas clássicas como a depleção da área T-dependente da polpa branca, evidenciada microscopicamente na maioria dos animais estudados. Cães do grupo Ant+Alo e Alo apresentaram uma redução significativa da celularidade dos seios medulares em comparação ao grupo LipV, com tendência a um menor parasitismo tecidual. Podemos dizer que os animais sob os diferentes protocolos terapêuticos, apesar da melhora clínica e parasitológica, devam ser acompanhados por um maior período de tempo, visto que alterações histológicas como fibrose e degeneração foram notadamente encontradas no fígado dos animais tratados com antimoniato associado ao alopurinol e alopurinol sozinho.

Abstract

Leishmania are intracellular obligate parasites that reside predominantly in mononuclear phagocyte cells of vertebrate hosts. In the Americas, dogs (*Canis lupus familiaris*) are considered the main domestic reservoirs for human visceral leishmaniasis (HVL). In Brazil, the measures proposed for the LV control, consider early diagnosis and treatment of human cases, residual spraying insecticides to combat the insect vector and dogs serological survey, with following euthanasia of positive animals. However, dog's euthanasia is not sustained by economic, social and ethical concerns. The treatment of infected dog with conventional therapy is questionable thus use of liposomal formulations with leishmanicidal activity is a promising strategy. Added to this, the co-treatment with leishmaniostatic drugs represents a good strategy in canine visceral leishmaniasis (CVL) treatment. In our study, treated dogs were divided in six groups as follow: Group I composed by eight dogs treated with meglumine antimoniate encapsulated in liposomes (LMA) associated with allopurinol (Allop) denominated LMA+Allop; Group II composed by eight dogs treated with LMA; Group III composed by eight dogs treated with allopurinol (Allop); Group IV composed by eight dogs treated with empty liposome (LEMP) associated with Allop denominated group LEMP+Allop; Group V composed by eight dogs treated with LEMP. Group VI composed by twelve dogs treated with saline solution (SG). The recommended therapeutic protocol consisted in six administrations every 96h, of 6.5 mg/kg/i.v. LMA; six administrations every 96h, intravenously, into the corresponding volume of empty liposome; and 20mg/kg of allopurinol, once daily for a period of 140 days. Clinical assessments were done before treatment begins, named time (T0) and at moments corresponding

to 50, 80, 110, 140, 170 and 201 days after establishment of treatment (T50, T80, T110, T140, T170 and T201). Similarly, peripheral blood samples were collected at time T0, T60, T140 and T200. The procedure was peripheral blood mononuclear immunostaining cells with anti-CD11b, anti-MHCII, anti-TL-2, anti-CD4 and anti-CD8 evaluated by the flow cytometry technique. Skin biopsies, of the inside region of the right pina, were collected at T0, T60, T140. In T200 samples of skin, liver, spleen, superficial cervical lymph nodes were collected during necropsy, which was processed for routine histological evaluations. Semi-quantitative and qualitative histologic studies and parasitism evaluation (immunohistochemistry) were performed using conventional optical microscopy. The Allop group concerning mainly associated with LMA promoted significantly reduced parasitism load (skin, liver and spleen) and clinical improvement of all animals. However, despite this improvement, in dogs studied, was not observed immune response modulation (CD4/CD8 lymphocyte population frequency). Furthermore, the TLR-2 and CR3 expression, in CD14+ monocytes, despite variations observed, along the kinetics of different treatment protocols, did not correlate with the clinical picture. Allopurinol treated dogs mainly associated with LMA showed remission of dermatological classic signs of LVC. Those Allop group, mainly LMA associated showed histological alterations decreased mainly characterized by a lower chronic dermatitis frequency. Allopurinol treated dogs and meglumine antimoniate encapsulated in liposomes treated groups showed significantly lower relative liver weight than in the empty liposomes group. Allopurinol treated dogs with the various associations and treated dogs with encapsulated meglumine antimoniate liposomes when compared to empty liposomes group, showed a decrease of intralobular hepatic granulomas

number and hepatic chronic signs. Meglumine antimoniate encapsulated liposomes group associated with allopurinol showed significantly lower in relative weight of the spleen than in the allopurinol-treated group and control. The treatment in the different experimental conditions did not showed significantly alteration in conventional splenic lesions as white pulp T-dependent depletion zone that was observed in most animals studied. The LMA+Allop and Allop groups showed a significant sinus medullary cellularity reduction as compared to the empty liposome group with a lower trend tissue parasitism. We could say that the animals under different therapeutic protocols, despite the clinical and parasitological improvement, must be accompanied by a longer period of time, since histological changes such as fibrosis and degeneration were mainly found in the liver of LMA + Allop and Allop groups.

Lista de Ilustrações

- Gráfico 1: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães antes do início do protocolo terapêutico (T0) com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol..... 74
- Gráfico 2: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201)..... 75
- Gráfico 3: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com lipossomas nanométricos vazios antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201) 76
- Gráfico 4: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201)..... 77
- Gráfico 5: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com lipossomas nanométricos vazios associado ao alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201) 78
- Gráfico 6: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201)..... 79
- Gráfico 7: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães controle nos momentos das avaliações clínicas (T0, T50, T80, T110, T140, T170 e T201)..... 80
- Gráfico 8: Cinética de alterações fenotípicas de monócitos CD14⁺ em relação à intensidade de fluorescência média (IFM) de CD11b/CD18 considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a, b e c), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis 141
- Gráfico 9: Cinética de alterações fenotípicas de monócitos CD14⁺ em relação à intensidade de fluorescência média (IFM) de TLR-2 considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo:

antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste T de kruskal wallis. 85

Gráfico 10: Cinética de alterações fenotípicas de monócitos CD14⁺ em relação à intensidade de fluorescência média (IFM) de MHC classe II considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a, b e c), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis. 87

Gráfico 11: Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ em células mononucleares do sangue periférico de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis. 89

Gráfico 12: Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ em células mononucleares do sangue periférico, considerando o mesmo período de avaliação (T0, T60, T140, T201), entre os cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico. Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis. 90

Gráfico 13: Cinética de alterações fenotípicas de linfócitos T em relação à intensidade de fluorescência média (IFM) de CD4 considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a, b e c), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis... 92

Gráfico 14: Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ em células mononucleares do sangue periférico de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado

em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis 94

Gráfico 15: Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ em células mononucleares do sangue periférico, considerando o mesmo período de avaliação (T0, T60, T140, T201), entre os cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico. Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis. 95

Gráfico 16: Cinética de alterações fenotípicas de linfócitos T em relação à intensidade de fluorescência média (IFM) de CD8 considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b) diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis..... 97

Gráfico 17 Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães antes do início do protocolo terapêutico (T0) 99

Gráfico 18: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201)..... 100

Gráfico 19: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com lipossomas nanométricos vazios antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201) 101

Gráfico 20: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol antes do tratamento (T0) e no momento das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201)..... 102

Gráfico 21: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com lipossomas nanométricos vazios associado ao alopurinol antes do tratamento (T0) e no momento das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201)..... 103

- Gráfico 22: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201)..... 104
- Gráfico 23: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães controle antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201) 105
- Gráfico 24: Número de cães com alterações histopatológicas dermatológicas relacionadas à leishmaniose visceral, submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T140 e T201)..... 109
- Gráfico 25: Grau de infiltrado inflamatório na pele da face interna da pina direita dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T140 e T201). Ant: antimoniató de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniató de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos marcados diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis 116
- Gráfico 26: Determinação da presença de amastigotas imuno-marcadas na pele da face interna da pina direita de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T201), pela técnica da estreptoavidina-peroxidase (IHQ) 118
- Gráfico 27: Grau de degeneração hidrópica no fígado dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. Ant: antimoniató de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniató de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis 128
- Gráfico 28: Presença de granulomas intralobulares no fígado dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. Ant: antimoniató de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniató de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b) diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis. 129

Gráfico 29: Determinação da presença de amastigotas imuno-marcadas no fígado de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201, pela técnica da estreptoavidina- peroxidase (IHQ). Ant: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da positividade pela IHQ: 1- ausência de infiltrado; 2- presença de pelo menos uma amastigota de *L. chagasi*. 130

Gráfico 30: Grau de depleção da área T dependente no baço dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. Ant: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis 140

Gráfico 31: Determinação da presença de amastigotas imuno-marcadas no baço de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201, pela técnica da estreptoavidina- peroxidase (IHQ). Ant: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da positividade pela IHQ: 1- ausência de infiltrado; 2- presença de pelo menos uma amastigota de *L. chagasi*. Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b) diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis. 141

Gráfico 32: Grau de espessamento e inflamação da cápsula do linfonodo cervical superficial dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. 148

Gráfico 33: Grau de hiperplasia cortical e reatividade folicular do linfonodo cervical superficial dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. 149

Gráfico 34: Grau de hiperplasia e hipertrofia das células dos cordões medulares e celularidade dos seios medulares do linfonodo cervical superficial dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. Ant: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b) diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis 151

Gráfico 35: Determinação da presença de amastigotas imuno-marcadas no linfonodo cervical superficial de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201, pela técnica da estreptoavidina- peroxidase (IHQ). Ant: antimoniatado de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniatado de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da positividade pela IHQ: 1- ausência de infiltrado; 2- presença de pelo menos uma amastigota de *L. chagasi*. Grupos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis. 152

Figura 1: Sequência representativa da estratégia de análise de monócitos obtidos do sangue periférico (PBMC). O gráfico A mostra a dispersão lateral da luz (SSC) (eixo das ordenadas) versus a expressão de CD14 (eixo das abcissas), com seleção da região de interesse. O gráfico B mostra a distribuição unimodal do marcador, na população de monócitos previamente selecionados. O gráfico C mostra uma população de monócitos (CD14⁺) previamente selecionados, que apresentam marcação para CD11b e TLR-2, sendo que o estabelecimento da população, duplamente marcada, foi feito levando-se em consideração o ponto de corte estabelecido pela célula e pelo controle de isotipo correspondente..... 63

Figura 2: O gráfico A mostra a seleção da região R1, em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulocidade (SSC) baseada em aspectos morfológicos da população celular de interesse. Os linfócitos apresentando-se como FSC^{Low}SSC^{Low}. O gráfico de pontos B mostra no quadrante superior esquerdo (Q1) a população positiva para CD4 e negativa para CD8, no quadrante superior direito (Q2) a população duplamente positiva para CD4 e CD8, no quadrante inferior direito (Q3) a população positiva para CD8 e negativa para CD4 e no quadrante inferior esquerdo (Q4) a população duplamente negativa para ambos os marcadores. O gráfico C e D mostram a distribuição unimodal do marcador CD4 e CD8, respectivamente, na população de linfócitos previamente selecionados 64

Figura 3: Micrografia da pele de orelha de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: A) Alterações epidérmicas podem ser evidenciadas como: hiperqueratose/ortoceratose (asterisco), degeneração hidrópica (seta fina); acantose (haste serifada). Hematoxilina–Eosina (HE) (Aumento 100x; Barra=62µm). B) Presença de hiperqueratose/ortoceratose (asterisco) e hiperqueratose folicular (HF) na epiderme. Podemos observar também, infiltrado inflamatório difuso, densamente celularizado (estrela), na derme superficial (DS) e profunda (DP), o qual se estende até próximo a cartilagem (Ca). Vaso linfático (vl), vaso capilar (vc). Hematoxilina–Eosina (HE) (Aumento 100x; Barra=62µm). C) Detalhe da fotomicrografia anterior com alterações epidérmicas tais como: hiperqueratose (asterisco), hiperqueratose folicular (HF), degeneração hidrópica (seta fina) e espongirose (cabeça de seta). Na região da derme superficial (DS) observar presença de infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear (seta larga) com presença de amastigotas (seta amarela). Hematoxilina–Eosina (HE) (Aumento 400x; Barra=16µm). 108

Figura 4: Micrografia da pele de orelha de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: A) Presença de hiperkeratose/ ortokeratose na face externa da epiderme (asterisco). Na região da derme observar infiltrado inflamatório difuso densamente celularizado (estrela), distribuído na derme superficial (DS) e derme profunda (DP), principalmente próximo aos folículos pilosos (FP). Hematoxilina-Eosina (HE) (Aumento 100x; Barra=62µm). B) Detalhe da figura anterior evidenciando: hiperkeratose/ortokeratose (asterisco), infiltrado inflamatório difuso densamente celularizado (estrela), disposto predominantemente na derme profunda (DP) ao redor e abaixo dos folículos pilosos (FP). Hematoxilina-Eosina (HE) (Aumento 200x; Barra=32µm). C) Infiltrado inflamatório crônico (estrela) composto por plasmócitos (seta larga) e macrófagos (seta fina) na derme profunda (DP) próximo ao folículo piloso (FP). D) Observe a plasmocitose (seta larga) e alguns macrófagos (seta fina). Hematoxilina-Eosina (Aumento 400x; Barra=16µm). E) Presença de amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de células mononucleares (seta amarela). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento 400x; Barra=16µm). F) Presença de amastigotas imunomarcadas (seta amarela). IHQ-Estreptoavidina-Peroxidase (Aumento 400x; Barra= 16µm). 114

Figura 5: Fragmento de fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Fragmento de fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. A) Nessa fotomicrografia podemos evidenciar espaço porta, no qual podemos verificar ramos da veia porta (VP) e ramo da artéria hepática (AH). Notar infiltrado inflamatório ao redor do espaço porta. No campo direito da figura observar no lóbulo hepático presença de intensa degeneração evidenciada pelos hepatócitos hipocorados (asterisco). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 100x; Barra: 62µm) (B) Detalhes da figura anterior evidenciando infiltrado inflamatório predominantemente plasmocitário (seta larga), linfócitos (seta fina) e macrófagos (cabeça de seta). Observar ao lado intenso processo degenerativo, sendo que os hepatócitos apresentam aspecto baloniforme e citoplasma hipocorado. Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm). C) Notar formação de granuloma intra-lobular constituído por células epitelióides (seta fina), linfócitos (cabeça de seta) e plasmócitos (seta fina). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm). D) Notar a formação e localização de um granuloma envolvendo a veia centro-lobular (VCL). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm). E) Formação de um trombo-embolo no ramo da artéria hepática (AH) e na veia centro lobular (VCL). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 100x; Barra: 62µm). F) Detalhe da figura anterior mostrando trombo-embolo predominantemente constituído por rede eosinofílica (fibrina) Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm). 123

Figura 6: Fragmento de baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Fotomicrografia panorâmica evidenciando cápsula espessa (asterisco). Na região subcapsular observa-se a presença de infiltrado inflamatório densamente celularizado difuso composto por linfócitos e macrófagos (seta fina). No parênquima esplênico observar formações nodulares (estrela). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 100x; Barra: 62µm). (B) Detalhe da figura anterior com macrófagos de aspecto vacuolado na região subcapsular (seta fina) contendo inúmeras formas de *Leishmania*. Granuloma evidenciado no parênquima (estrela). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 100x; Barra: 62µm). (C) No centro da figura detalhe da formação de um granuloma constituído por células mononucleares. Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 200x; Barra: 32µm). (D) Detalhe da figura anterior, granuloma composto por macrófagos (seta fina), por plasmócitos (seta larga) e por linfócitos (cabeça de seta), abaixo se observa megacariócitos (MC). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 400x; Barra: 16µm). (E) Polpa branca (PB) reativa com hiperplasia e hipertrofia do nódulo linfóide, com formação de

centro germinativo (CG). Observar também reatividade da bainha peri-arteriolar (BPA), ao lado da arteriola central da polpa branca (AC). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 400x; Barra: 16µm). (F) Detalhe da figura anterior onde podemos evidenciar ao redor da arteriola central da polpa branca (AC) grande quantidade de linfócitos. Hematoxilina-Eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm). (G) Fotomicrografia da polpa branca (PB) não reativa com ausência de centro germinativo e área T dependente. Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 400x; Barra: 16µm). (H) Detalhe da figura anterior, área T dependente (BPA) substituída por inúmeros plasmócitos (seta larga) e macrófagos (seta fina). Hematoxilina-Eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm,). 135

Figura 7: Fragmento de linfonodo cervical superficial de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Fotomicrografia panorâmica evidenciando cápsula espessada devido a processo inflamatório intenso (grande barra). Observar limitação de cápsula e camada cortical pelas fibras colágenas eosinofílicas (cruz fina). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 20x; Barra = 32µm). (B) Detalhe da figura anterior, na região da capsula, mostrando infiltrado inflamatório crônico composto por macrófagos de aspecto vacuolado contendo inúmeras formas de *Leishmania* (seta fina), plasmócitos (seta larga) e por linfócitos (cabeça de seta). Hemtatoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 40X; Barra: 16µm). (C) Observar cápsula inflamada (linfadenite capsular) e cortical sem formação de folículos linfoides. Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento de 20x; Barra: 32µm). (D) Detalhe da figura anterior mostrando a substituição de linfócitos (setas finas) por macrófagos parasitados (cabeças de seta) e grande número de plasmócitos (setas largas). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 400x; Barra: 16µm). (E) Observar hipertrofia e hiperplasia dos cordões e seios medulares Hemtatoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 200x; Barra = 32µm). (F) Detalhe da figura anterior evidenciando cordões e seios com inúmeras células mononucleares sendo linfócitos (setas finas), macrófagos por vezes parasitados (cabeças de seta) e grande numero de plasmócitos (setas largas). Nos seios medulares nota-se a presença de edema (cruz fina) e macrófagos abarrotados de pigmentos de coloração castanha (flecha). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 400x; Barra: 16µm). (G,H) Cortical evidenciando grande proliferação celular em aspecto de céu estrelado Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 200x e Barra: 32 µm; Aumento 400x e 16 µm, respectivamente). Cap = Capsula; CC= Camada Cortical; CM= Cordões Medulares; SM= Seios Medulares; TG= Tecido Gorduroso..... 146

Lista de Tabelas

Tabela 1: Distribuição dos 52 animais nos grupos experimentais, após sorteio, de acordo com o gênero e peso médio.....	55
Tabela 2: Painel de Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular	60
Tabela 3: Principais alterações histopatológicas avaliadas na pele, nos linfonodos cervical superficial, baço e fígado	68
Tabela 4: Avaliação do perfil inflamatório da pele da face interna da pua direita em cães naturalmente acometidos com <i>Leishmania chagasi</i> submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos da avaliação clínica (T140 e T201)	111

Lista de Abreviaturas

μg = Micrograma

μL = Microlitro

ALT= Alanina aminotransferase

APC= Célula apresentadora de antígeno

AST= Aspartato aminotransferase

CCZ = Centro de Controle de Zoonoses

CD= Grupamento de diferenciação "Cluster of differentiation"

CD14= Marcador de superfície celular da população de monócitos

CD4= Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CD8= Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CETEA= Comitê de Ética em Experimentação Animal

CR3= Receptor 3 do complemento

EDTA= Ácido etileno diamino tetraacético

ELISA =Ensaio imunoenzimático

FA = Fosfatase alcalina

FACS= Fluorecence Acitivated Cell Sorter

FITC= Isotiocianato de fluoresceína

FL= Fluorescência

FSC= Forward Angle Light Scatter (Tamanho celular)

g = Gravidade

HE = Hematoxilina e eosina

IFM Intensidade de Fluorescência média

IL = Interleucina

LPG= Lipofosfoglicano

LSA= Antígeno solúvel de Leishmania chagasi

LV= Leishmaniose visceral

LVC = Leishmaniose visceral canina

LVZ = Leishmaniose visceral zoonótica

LVA = Leishmaniose visceral antroponótica

Lu. Longipalpis = *Lutzomyia longipalpis*

M = Molar

MHC= Complexo principal de histocompatibilidade

ml = Mililitro

mm = Milímetro

ng = Nanograma

NO= Óxido nítrico

PALS = Bainha linfoide peri-arteriolar

PAMP= Padrões moleculares associados à patógenos

PBMC= Células mononucleares do sangue periférico

PBS= Solução de fosfato tamponada

PCR= Reação em cadeia da polimerase

PE= Ficoeritrina

PMN= Polimorfonuclear

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta

SMF= Sistema mononuclear fagocitário

SSC= Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)

TLR = Tool like receptor

WHO = World Health Organization (OMS)

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO.....	29
2.0 LITERATURA CONSULTADA	32
2.1 Ciclo biológico da leishmaniose visceral	32
2.2 Leishmaniose visceral canina	34
2.2.1. <i>Quadro clínico</i>	34
2.2.2 <i>Resposta Imune</i>	37
2.2.3 <i>Tratamento</i>	40
4.0 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	46
5.0 OBJETIVO GERAL	47
5.1 Objetivos específicos.....	47
6.0 METODOLOGIA	48
6.1. Animais	48
6.1.2. <i>Manuseio dos animais</i>	50
6.2 - Sínteses dos Fármacos	50
6.2.1 – <i>Antimoniato de meglumina</i>	50
6.2.2 – <i>Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossoma nanométrico</i>	51
6.2.3 – <i>Lipossoma na ausência de Sb⁵⁺ - Lipossoma “vazio”</i>	53
6.2.5 – <i>Protocolos de tratamento</i>	53
6.3 Colheita e preparação de material para análise	56
6.3.1. <i>Coleta de amostra de sangue e soro</i>	56
6.4. Obtenção e análise dos dados por citometria de fluxo	58
6.4.1. <i>Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo</i>	61
6.5. Exames parasitológicos	65
6.5.1 <i>Obtenção e preparo das biópsias obtidas da face interna da pina direita</i>	65
6.5.2 <i>Imunoistoquímica – Técnica da estreptoavidina - peroxidase para detecção de formas amastigotas</i>	66
6.6. Protocolo de eutanásia	67
6.7. Avaliação anatomopatológica e parasitológica dos órgãos	68
6.7.1 – <i>Histopatologia</i>	68
6.8. Análise estatística	69
7.0 RESULTADOS	71

7.1 Resultados referentes ao primeiro artigo intitulado:	71
<i>Toll Receptors Type-2 and CR3 Expression of Canine Monocytes and Its Correlation with Immunohistochemistry and Xenodiagnosis in Visceral Leishmaniasis</i>	71
7.2 Resultados relacionados ao protocolo terapêutico	73
7.3. Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães antes do início do protocolo terapêutico (T0)	74
7.3.1. <i>Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico</i>	75
7.4 Citometria de fluxo	81
<i>Avaliação da IFM de CD11b/CD18 na população de monócitos CD14+</i>	82
<i>Avaliação da IFM de TLR-2 na população de monócitos CD14+</i>	84
<i>Avaliação da IFM de MHC classe II na população de monócitos CD14+</i>	86
<i>Avaliação da frequência de linfócitos T CD4</i>	88
<i>Avaliação da IFM de CD4 na população de linfócitos T CD4 de um mesmo grupo experimental</i>	91
<i>Avaliação da frequência de linfócitos T CD8</i>	93
<i>Avaliação da IFM de CD8 na população de linfócitos T CD8 de um mesmo grupo experimental</i>	96
7.5 – Análises Histopatológicas	98
TEGUMENTO	98
7.5.1. <i>Alterações anatomopatológicas da pele da face interna da pina direita antes do início do tratamento</i>	98
7.5.2. <i>Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de tamanho nanométricos associados ao alopurinol, antes do tratamento e nos momentos da avaliação clínica</i>	100
7.5.3. <i>Alterações histopatológicas da pele da face interna da pina direita</i>	106
7.5.3.1 <i>Características do exsudato inflamatório</i>	110
7.5.3.2 <i>Avaliação da positividade parasitária</i>	117
FÍGADO	119
7.6. Peso relativo (g/ 100g p.v)	119
7.6.1 – <i>Macroscopia</i>	120
7.6.2 – <i>Microscopia</i>	121
7.7.3 – <i>Avaliação da carga parasitária</i>	130
BAÇO	131
7.8. Peso relativo do baço (g/ 100g p.v)	131
7.8.1 – <i>Macroscopia</i>	132
7.8.2 – <i>Microscopia</i>	133
7.8.3 – <i>Avaliação da densidade parasitária no baço</i>	141
LINFONODO CERVICAL SUPERFICIAL	142
7.9 Peso relativo (g/ 100g p.v)	142
7.9.1 – <i>Microscopia</i>	143
7.9.2 – <i>Avaliação da densidade parasitária no linfonodo cervical superficial</i>	152

8.0 DISCUSSÃO.....	153
9.0 CONCLUSÕES.....	185
10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	188
ANEXOS.....	200
ANEXO 1	200
ANEXO 2	201
ANEXO 3 e 4	202
ANEXO 5	203
ANEXO 6	204
ANEXO 7	205

1.0 INTRODUÇÃO

Segundo Lainson e Shaw (1987) os parasitos do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) são flagelados da Família Trypanosomatidae (Doflein, 1901; Woodcock, 1906), Ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963; Vickerman, 1976) e Filo Protozoa.

Em pacientes humanos, as leishmanioses caracterizam-se por ser um grupo de doenças causadas por mais de 20 diferentes espécies do gênero *Leishmania*. De acordo com o quadro clínico apresentado e com a espécie infectante, podem ser classificadas em: leishmaniose tegumentar americana (LTA), a qual apresenta vasto espectro clínico-imunológico de apresentação e a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar (WHO, 2012).

Dentro da LTA, a leishmaniose cutânea (LC) se caracteriza pela presença de formações ulcerativas na pele que variam em número sendo, usualmente, auto-limitantes. Nesse caso, os pacientes apresentam perfil de resposta imune celular bem equilibrado. Quando o sistema imune não se mostra capaz de combater a doença efetivamente pode ocorrer a disseminação destas lesões pelo corpo, assinalando assim o quadro de LC difusa, também denominado de LC anérgica difusa. Por sua vez, associado ao pólo imunológico hiper-reativo, com presença de forte hipersensibilidade celular, com destruição de membranas mucosas na região nasofaríngea, temos a chamada leishmaniose muco-cutânea (LMC) (Silveira et al., 2009).

A LV é a forma mais grave, sistêmica, sendo letal quando não tratada. Eventualmente, pode ocorrer uma condição caracterizada pela presença de nódulo na pele, sendo denominada dermatite pós-calazar (WHO, 2012).

As leishmanioses constituem um grave problema de Saúde Pública, com prevalência global estimada em 12 milhões de casos e incidência anual de 1,5-2,0 milhões de casos, sendo 1,0 a 1,5 milhões de LC e 500.000 de LV (Desjeux, 1996; Palatnik-de-Souza e Day, 2011). Segundo Nieto et al. (1999) um terço da população mundial reside em áreas endêmicas.

No contexto mundial, a LV é observada em algumas regiões da Índia, Bengala Ocidental e extremo sul; norte da China e Indochina. Na Europa, aparece disseminada no sul da Rússia e em todo o litoral da Bacia do Mediterrâneo, com focos endêmicos importantes na Grécia, sul da Itália, França e Espanha. Na África, essa afecção ocorre ao norte, Região do Mediterrâneo, em Marrocos e na Argélia e também ao sul do continente, em países como Sudão e Quênia. Nas Américas tem sido assinalada no Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia, Venezuela, Colômbia, Peru, Guatemala e México (FIOCRUZ, 1997).

A emergência da LV como um problema de Saúde Pública se atribui, principalmente, a fatores demográficos e ecológicos (Desjeux, 2002). No Brasil observa-se nítido processo de transição epidemiológica da doença, com incidência crescente nos últimos anos nas áreas onde ocorria tradicionalmente, expansão geográfica para os Estados ao sul do país e também um franco processo de urbanização em cidades localizadas em regiões distintas como o Nordeste e o Sudeste (Alves e Bevilacqua, 2004). Em revisão de literatura, Lainson e Rangel (2005) citam que a distribuição da LV no Brasil inclem os Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Roraima, Sergipe,

São Paulo e Tocantins. Segundo os dados do Ministério da Saúde, no período entre 2003 e 2009, foram registrados 34.583 casos de LV no país, sendo que, no ano de 2009, a região Nordeste contribuiu com 47,5% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro-Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). Atualmente, a LV encontra-se distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras (Ministério da saúde, 2011).

No âmbito de Belo Horizonte, desde 1992, sua região metropolitana tem sofrido expansão da LV causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, com crescente número de casos humanos e caninos, introduzida a partir do município de Sabará (Michalick et al., 1993). Visando o controle da LV a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a eutanásia dos cães soropositivos, associada ao tratamento dos casos humanos e combate ao vetor, embora reconheça as limitações do primeiro procedimento (WHO, 1990). De fato, a eutanásia dos cães geralmente não é aceita por questões éticas e sociais (Moreno e Alvar, 2002; Ribeiro et al., 2008); assim, pesquisas com o objetivo de buscar drogas que possam determinar cura completa para os cães infectados continuam um dos grandes desafios para o controle da doença (Baneth, 2002; Schettini et al., 2003; Ribeiro, 2008).

2.0 LITERATURA CONSULTADA

2.1 Ciclo biológico da leishmaniose visceral

A *Leishmania (Leishmania) donovani* constitui o agente etiológico da LV na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Quênia; a *L. (L.) infantum* na Região do Mediterrâneo e *L. (L.) chagasi* no Novo Mundo (Guerin et al., 2002). As duas últimas espécies são consideradas coespecíficas, dentro do complexo *L. donovani*, segundo estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares (Maurício et al., 1999).

No Brasil, a LV representa uma doença zoonótica sendo transmitida pela picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia*, cujo principal vetor é *Lu. longipalpis*. Entretanto, sabe-se que no ano de 1998 a *Lu. cruzi* foi identificada como um vetor na cidade de Corumbá, Mato Grosso do Sul, e evidências de transmissão da LV por essa mesma espécie foram descritas na cidade de Jaciara, Mato Grosso (Maia-Elkhoury et al., 2008). As fêmeas destes flebotomíneos, assim como outros dípteros hematófagos, possuem um caráter oportunista e por ocasião de seu repasto sanguíneo uma ampla variedade de vertebrados faz parte de sua alimentação no ambiente antrópico (Desjeux, 2002; Dias et al., 2003).

Na epidemiologia da LV, o cão (*Canis lupus familiaris*) constitui o principal reservatório doméstico do parasito, o que lhe confere potencial importância na manutenção da LV no ambiente domiciliar (Deane e Deane, 1962). No ambiente silvestre, os principais reservatórios são também canídeos, destacando-se as raposas *Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus* (Shaw, 2003).

No Novo Mundo, gambás - *Didelphis marsupialis* (Corredor et al., 1989; Zulueta et al., 1999) e ratos - *Rattus rattus* (Zulueta et al., 1999) foram encontrados naturalmente infectados por *L. chagasi*, sendo também incriminados como reservatórios silvestres da LV. Portanto, a presença peridomiciliar de animais domésticos e sinantrópicos possui uma grande importância na manutenção da *Lu. longipalpis* (Desjeux, 2002; Dias et al., 2003).

A *L. chagasi* é um parasito digenético e seu ciclo biológico se inicia no momento em que fêmeas de *Lu. longipalpis* realizam o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. Nesse momento, pode ocorrer a ingestão de formas amastigotas do parasito, existentes nos vacúolos de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente macrófagos, na derme, juntamente com componentes do repasto sanguíneo. Uma vez no intestino médio do flebótomo, essas formas amastigotas se diferenciam nas chamadas promastigotas procíclicas que são móveis, capazes de se aderir ao epitélio do tubo digestivo e se multiplicar por divisão binária. Essas possuem uma camada de moléculas de glicoconjugados, lipofosfoglicanos (LPG), em sua superfície, consistindo de um núcleo glicano, uma âncora lipídica altamente conservada e unidades variáveis de oligossacárides. Interações envolvendo LPG com lectinas e moléculas tipo lectinas presentes no intestino do inseto impedem que as formas promastigotas procíclicas sejam eliminadas juntamente com o bolo alimentar. Extensa modificação estrutural, durante a metaciclogênese, envolvendo o tamanho e a expressão de açúcares de LPG, transformam essas formas em promastigotas metacíclicas. A expressão de grande quantidade de LPG, bem como de outros glicoconjugados, como a metaloprotease - gp63, na superfície do parasito é capaz de protegê-lo da ação das enzimas hidrolíticas

presentes no intestino do flebotomíneo (killick-kendrick, 1990; Alexander et al., 1999). As promastigotas metacíclicas apresentam reduzida afinidade de ligação às lectinas, levando ao desligamento do epitélio intestinal e migração para a probóscida do inseto. Em nova alimentação, as formas promastigotas metacíclica infectantes são depositadas na derme do próximo hospedeiro, junto à saliva do inseto, sendo internalizadas por macrófagos, processo esse, mediado por receptores (Cunningham, 2002; de Almeida, 2003). As promastigotas se diferenciam em formas amastigotas, nos fagolisossomas. Dentro das células do SMF, as amastigotas multiplicam-se por divisão binária, até rompimento da célula hospedeira, com posterior infecção de novas células. O flebotomíneo, ao realizar nova hematofagia, ingere os macrófagos infectados, perpetuando, assim, o ciclo biológico.

2.2 Leishmaniose visceral canina

2.2.1. *Quadro clínico*

Segundo Alvar et al. (2004) e Grima (2005), o período de incubação e a apresentação clínica da leishmaniose visceral canina (LVC) variam intensamente nos animais acometidos, partindo de total ausência até graves sinais clínicos. Na LVC, assim como em outras doenças parasitárias, fatores específicos dependentes do hospedeiro e do parasito determinam o desenvolvimento dos mecanismos patogênicos da doença, das lesões e, em última análise, dos sinais clínicos dos animais acometidos. Tais processos patogênicos têm como fator comum a presença do parasito e como fator de distinção as reações orgânicas, sejam elas de resposta imune ou não, de

efetividade e intensidade distintas (Ezquerro, 2001). Desta forma, após a inoculação de formas promastigotas na pele pelo inseto vetor, a resposta imune que ocorre no hospedeiro modula a apresentação clínica da afecção (Gama et al., 2004).

Pesquisas afirmam que a maior parte dos cães infectados pela *L. chagasi* são susceptíveis e acabam por desenvolver a doença patente, enquanto uma pequena porcentagem se mostra resistente compreendendo um grupo em que não há manifestação dos sinais ou, caso ocorra, há espontânea remissão destes. A apresentação mais evidente da doença nos cães é a leishmaniose viscerocutânea, onde se observam alterações do tegumento, renais, hepáticas, esplênica e oculares (Nieto et al., 1992; García-Alonso et al., 1996).

O período inicial da infecção, geralmente cursa como uma síndrome geral inespecífica, que pode passar despercebida, sendo caracterizada por discreta perda de peso, apatia e ocasionalmente episódios de febre (Grima, 2005). Os sinais posteriores, mais evidentes, são lesões de pele, com alopecia e intensa descamação seca, não pruriginosa e usualmente aparecendo na cabeça e se estendendo por todo o corpo; onicogribose; perda de peso progressiva muitas vezes acompanhada de anorexia; linfadenopatia local ou generalizada; lesões oculares, como blefarite e ceratoconjuntivite bilaterais; epistaxe; anemia; falência renal, em consequência à deposição de imunocomplexos e diarreia, onde exames endoscópicos e espécimes para biópsia evidenciaram colite ulcerativa e inflamação granulomatosa da mucosa intestinal (Genaro, 1993; Ferrer, 1999; Grima, 2005).

Avaliando o quadro clínico-patológico de cães natural e experimentalmente infectados por *L. infantum*, Martínez-Moreno et al. (1995) observaram que os sinais clínicos encontrados no grupo experimentalmente infectado consistiam em perda de peso, apatia, discreta linfadenopatia, alopecia na face e extremidades; ao passo que, no grupo naturalmente infectado além dos achados anteriores foram observados outros como astenia, lesões ulcerativas, onicogribose, conjuntivite e rinite. Nos dois grupos, a *Leishmania* foi isolada e identificada através de exames microscópicos de fragmentos retirados do baço, linfonodos, fígado, rins, pele e sistema reprodutivo. Tendo como objetivo também o acompanhamento da evolução clínico-patológica da LVC, Nieto et al. (1999) avaliaram quatro cães infectados experimentalmente em um período de 343 dias. Os dados revelaram que aos 75 dias após a infecção formas amastigotas podiam ser observadas nos linfonodos poplíteos de todos os animais infectados, sendo que, o primeiro sintoma observado foi a linfadenomegalia. Em um cão, a infecção se manifestou de forma latente com presença de dermatite e onicogribose. Dois animais desenvolveram a forma patente ou sintomática da LVC, ou seja, perda de peso, adenopatia, onicogribose e dermatite esfoliativa e ulcerativa na cauda, orelhas e extremidades. Inversamente, em um cão houve remissão dos sintomas aos 200 dias, com subsequente citologia negativa de aspirado de linfonodo.

2.2.2 Resposta Imune

A resposta imune contra antígenos de natureza protéica, como as formas de *Leishmania*, é regulada, em grande parte, por células T CD4⁺ ou linfócitos T auxiliares (Th) que têm a capacidade de produzir uma grande variedade de citocinas em resposta a estes antígenos (London et al., 1998).

Pesquisas anteriores demonstraram que clones de células T CD4⁺, em modelo murino, poderiam ser divididos em dois subtipos, fundamentados no perfil de citocinas secretadas em resposta a um antígeno. O subtipo de células T, denominado de Th-1, secretava interleucina (IL)-2, interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α e linfotóxina (LT); enquanto o subtipo Th-2 secretava IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (Mosmann et al., 1986; Fiorentino et al. 1989).

Segundo Abbas et al. (2002), o IFN- γ constitui a principal citocina do subtipo Th-1 que atua na ativação e incremento da atividade microbicida de macrófagos e estimula a produção de IgG fixadora de complemento. Além disso, as citocinas produzidas por esta população promovem a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ em células citotóxicas e ativação de neutrófilos e células “natural killer”. Desta forma, as citocinas produzidas pela população Th-1 estimulam a fagocitose de microorganismos e eliminação de patógenos intracelulares (London et al. 1998).

Estudo realizado por Jaffe (1999), com o objetivo de se verificar o perfil da resposta imunológica na LV, observou no modelo murino que os animais apresentavam cura quando desenvolviam resposta predominantemente celular do tipo Th-1. Os fatores que determinam o desenvolvimento patente das manifestações clínicas da LV não estão completamente identificados. A

deficiente produção de IFN- γ , após a exposição ao antígeno *Leishmania*, é um fator relatado normalmente e está associado com incremento de células T CD4⁺ expressando um perfil de citocinas Th-2, com a produção de IL-4 e IL-10, mas não de IL-2 ou IL-12 (Gama, 2004).

Segundo Pinelli et al. (1994), em cães a infecção sintomática está associada com a crescente produção de anticorpos e imunorregulação negativa da resposta imune celular periférica, associada a decrescente produção de IL-2, IFN- γ e FNT- α com ineficiente eliminação do parasito. Desta forma, cães sensíveis a LV tendem a desenvolver resposta imune predominantemente humoral caracterizada por hipergamaglobulinemia policlonal, enquanto que, os resistentes apresentam expressiva resposta celular (Ferrer et al., 1995). Entretanto, até o momento, o exato papel das citocinas do subtipo Th-2, em cães portadores de LV, não está completamente definido. Enquanto há uma correlação positiva entre patologia e incremento da produção de IL-10 em humanos, o envolvimento desta citocina em cães portadores de LV ainda é controverso. Com o intuito de verificar o perfil tecidual de citocinas em cães naturalmente infectados com LV, Quinnell et al. (2001) mensuraram os níveis de RNAm para IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13 e IL-18 em aspirados de medula óssea. Os níveis de IFN- γ mostraram-se mais elevados nos cães com LV em comparação aos cães saudáveis. Observou-se, também, correlação positiva significativa entre a presença de RNA-m para IFN- γ e os níveis de IgG1 anti-*Leishmania*. Contrariamente, não houve correlação com os níveis de IgG2, IgG4 e resposta linfoproliferativa ao antígeno *Leishmania*.

As descrições das respostas celular e humoral, em cães experimentalmente infectados, foram feitas por Martinez-Moreno et al. (1995)

durante um período de 110 dias. A avaliação humoral foi realizada através de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) e a responsividade das células T foi avaliada através da reação intradérmica (IDR) e ensaio linfoproliferativo *in vitro*. A resposta das células T ao antígeno de *Leishmania* foi negativa tanto na IDR quanto no ensaio *in vitro*, conjuntamente houve produção específica de anticorpos IgG anti-*Leishmania*. Esta ausência de resposta celular foi considerada específica uma vez que, no ensaio *in vitro*, quando submetida ao mitógeno concavalina-A houve linfoproliferação. Desta forma, as observações dos parâmetros imunológicos, nas primeiras semanas pós-infecção, sugerem que fatores responsáveis por esta resposta anérgica se manifestam muito rapidamente e que o desenvolvimento da doença nos cães está relacionado com a perda da imunidade celular específica e com uma considerável, mas inefetiva resposta do tipo humoral. Estes resultados coincidem com dados anteriores de Martinez-Moreno et al. (1993), que revelam ineficiente resposta imune mediada por células em cães portadores da forma sintomática de LV com presença precoce de anticorpos específicos anti-*Leishmania*.

A LVC está associada tanto com a ativação policlonal das células B, por componentes antigênicos do parasito, quanto à efetiva resposta clonal específica com produção de imunoglobulinas (Ig) anti-*Leishmania* (Quinnell et al. 2003). Martinez-Moreno et al. (1993), em pesquisa avaliando a atividade de linfócitos T e B em cães infectados por LV, concluíram que a presença da *Leishmania* leva a ativação dos linfócitos B com posterior transformação destes em plasmócitos. A resposta humoral específica da LVC caracteriza-se pela produção de elevados níveis de IgG anti-*Leishmania*, permitindo ampla

utilização do diagnóstico sorológico (Canãvate et al., 2005). Assim sendo, técnicas sorológicas constituem importantes ferramentas no diagnóstico e estudo da doença, estando fundamentadas na detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* (Gradoni, 2002).

2.2.3 Tratamento

No ano de 1912, coube a um cientista brasileiro, Gaspar Vianna, a vanguarda na utilização de um composto antimônio trivalente (Sb^{III}), o tártaro emético, para o tratamento da leishmaniose. A importância desta descoberta foi viabilizar o tratamento da LMC, com repercussões inclusive fora do Brasil (Vianna, 1912). Entretanto, em razão de seus graves efeitos colaterais, os complexos Sb trivalentes foram substituídos, a partir do ano de 1945, pelos antimoniais pentavalentes (Sb^{V}), os quais passaram a constituir as drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (Frezárd, 2001, Demicheli et al., 2002). Segundo os dois últimos autores, existem dois modelos propostos para os mecanismos de ação dos antimoniais pentavalentes. O primeiro seria que o Sb^{V} se comportaria como uma pró-droga, sendo reduzido por tióis a Sb^{III} , no organismo hospedeiro. Essa hipótese considera que o Sb^{III} seria a forma ativa e tóxica do antimônio. A biomolécula glutatona, que contém o grupamento sulfidrila e é o tiol predominante no meio intracelular, seria um forte candidato a agente redutor de Sb^{V} a Sb^{III} . Tem sido sugerido que nos meios biológicos o Sb^{III} interagiria com grupos sulfidrila de certas proteínas, resultando em perda de sua função. A outra hipótese foi formulada a partir da demonstração em que o Sb^{V} forma complexos com ribonucleosídeos (Sb^{V} -ribonucleosídeo) e que essa interação poderia ter implicações no mecanismo de ação dos antimoniais.

Existem comercialmente duas formas de apresentação dos antimoniais pentavalentes: o antimoniato de N-metil-D-glucamina (Glucantime[®], Rhodia), na América Latina e África, e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®], Welcome), nos EUA e Europa (Lima et al., 2007). Dentre os fármacos de segunda escolha podemos citar: o isotiocianato de pentamidina, que consiste em uma diamidina que se une ao DNA do cinetoplasto do parasito, com o mecanismo de ação primário desconhecido; o desoxicolato sódico de anfotericina B (e formulações lipossomais), antibiótico polieno que interage com o ergosterol da membrana celular capaz de formar poros que alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico, causando morte celular. Além disso, podemos citar os imunomoduladores como o interferon-gama (IFN- γ) e o fator de crescimento de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Ministério da Saúde, 2004).

Quando consideramos o tratamento da LVC, os fármacos comumente utilizados podem ser reunidos em dois grupos: os que apresentam ação direta sobre o parasito quer seja pela ação leishmanicida, quer seja como leishmaniostático (impedindo sua replicação), e os grupos capazes de modular o sistema imune como o levamisol, citocinas e vacinas (Ribeiro, 2007). Segundo Baneth (2002), as publicações referentes ao tratamento de animais com LVC avaliam a eficácia do protocolo terapêutico sob dois pontos principais: melhora dos sinais clínicos dos cães ou mudanças do padrão imunológico e sorológico. Outro importante aspecto parasitológico, entretanto abordado em menor escala, consiste na avaliação da capacidade infectante dos cães junto ao inseto vetor, quando da realização do xenodiagnóstico. Entretanto, as drogas anti-leishmanicidas usadas com sucesso na terapia em humanos têm

se mostrado de eficácia controversa no tratamento da LVC. Muitas das vezes, os fármacos induzem uma remissão temporária dos sinais clínicos, nem sempre previnem a ocorrência de recidivas e, frequentemente, causam vários efeitos colaterais. Adicionalmente, têm efeito limitado na infectividade de cães junto ao inseto vetor, levando ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas (Baneth, 2002; Baneth e Shaw, 2002; Noli e Auxilia, 2005).

Devido ao risco de desenvolvimento de resistência do parasito aos antimoniais, no Brasil, em parecer nº 0299/2004 da Advocacia Geral da União, o Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®], Rhône Mérieux, Lyon, França) teve sua distribuição e uso restrito ao serviço público de saúde, destinado ao tratamento humano, não podendo ser utilizado em nenhuma condição para o tratamento de cães com LV. Em medida semelhante, no ano de 2008, o ministério da Saúde juntamente com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento publicaram em Portaria Interministerial nº 1.426, Art. 1º, a proibição, em todo o território nacional, do tratamento de cães infectados com LV ou doentes com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ministério da Saúde, 2009).

Considerando que a estratégia adotada no Brasil, com relação ao controle da LV, está fundamentalmente dirigida verticalmente no: 1) diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos; 2) aspersão de inseticidas de ação residual para combate do inseto vetor e 3) eutanásia de cães, após inquérito sorológico (Ministerio da Saúde, 2004), medida pouco aceita por questões éticas e sociais (Moreno e Alvar, 2002; Ribeiro et al., 2008), a utilização de fármacos carregados em lipossomas representam uma estratégia promissora, já que esse sistema carreador aumenta consideravelmente a eficácia dos

antimoniais contra a LVC em estudos prévios (Frezárd, 1999; Schettini, 2003; Costa Val, 2004; Schettini, 2005; Schettini, 2006; Moura, 2007; Ribeiro, 2007; Ribeiro et al., 2008). Somado a isso, existe uma literatura internacional que considera a associação de antimoniato de meglumina e alopurinol, uma das terapias mais eficazes no tratamento da LVC (Alvar et al., 1994; Denerolle e Bourdoiseau, 1999; Baneth e Shaw, 2002; Noli e Auxili, 2005; Torres et al., 2011).

3.0 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral (LV) constitui uma das chamadas doenças tropicais negligenciadas, estando no Brasil, incluída na categoria 3, segundo a Organização Pan Americana de Saúde/ Organização Mundial de saúde (OPAS/OMS), uma vez que, o campo da saúde pública não possui ferramentas efetivas para o controle avançado.

O Ministério da Saúde (MS), em conjunto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) elaboraram e publicaram após o I Fórum de discussão sobre LV canina em Brasília/ DF, com a presença de expertos, a **Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008**, a qual: *“... proíbe o tratamento da LVC com produtos de uso humano ou não registrado no MAPA”*.

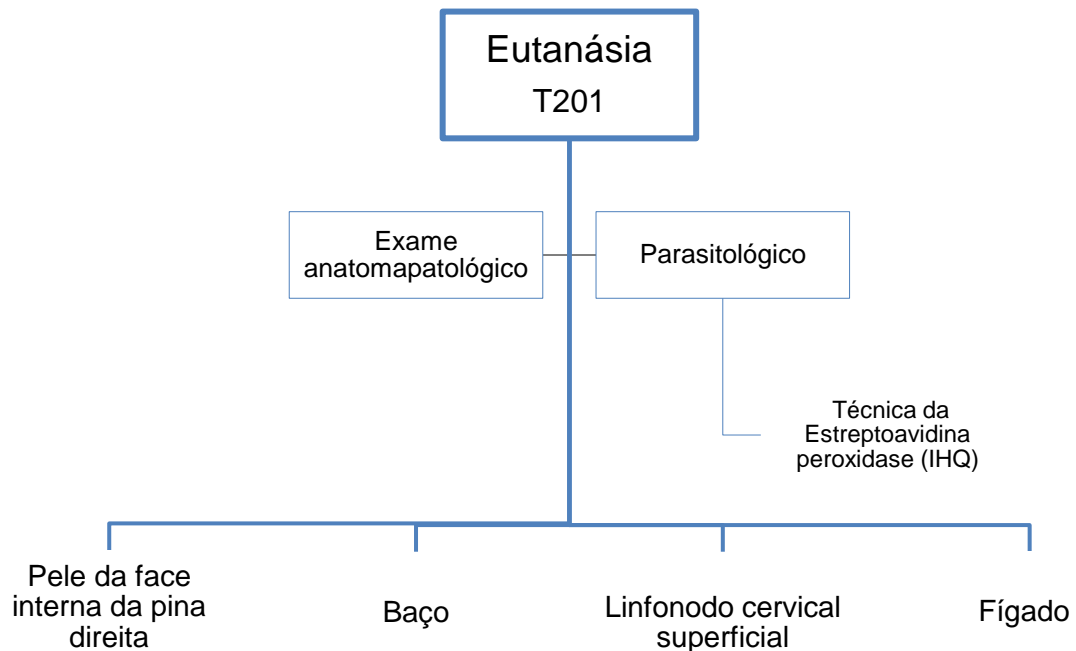
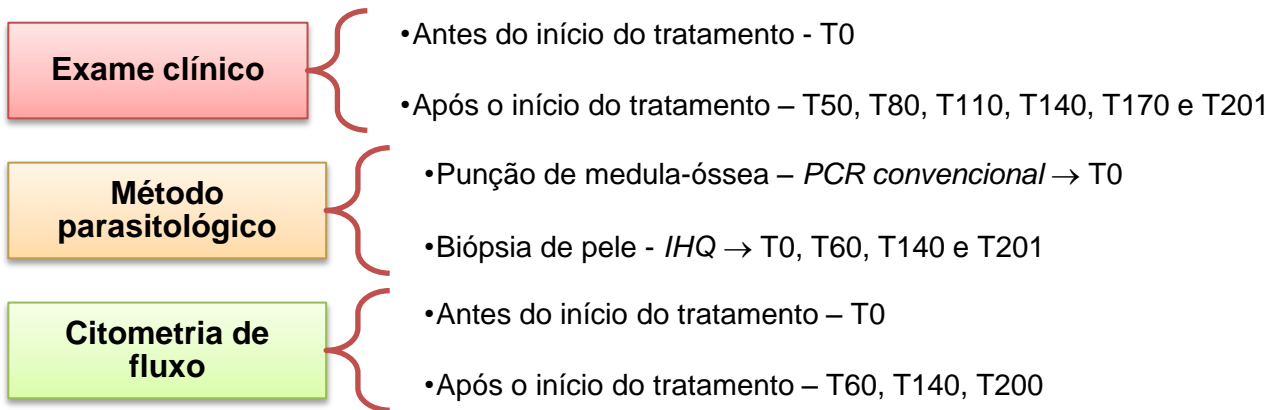
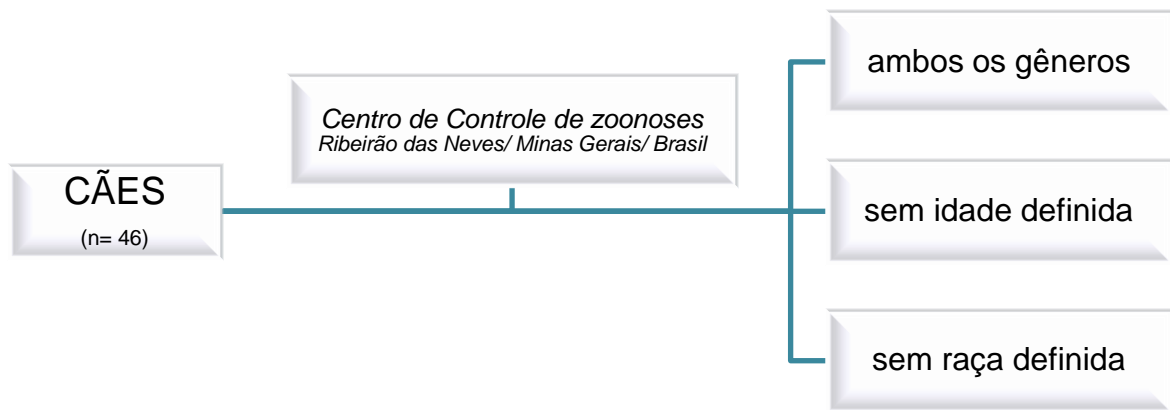
Considerando essa medida, várias ações foram impetradas contra a União, juntamente com a Ação Civil Pública movida no Estado de Minas Gerais, onde foram apresentados pelos requerentes informações fundamentadas em pesquisas sobre avanços nos estudos da LVC. Com o objetivo de avaliar essas ações, outro Fórum de discussão (II Fórum) sobre tratamento da LVC foi realizado em Brasília/DF concluindo que:

“... a recomendação desse fórum é de que seja mantida a proibição do tratamento da LVC pelos Ministérios da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme a Portaria IM nº 1.426 (2008) que regulamenta o Decreto nº 51.838 (1963)”.

A comunidade científica internacional tem apresentado algumas alternativas para o controle do vetor, assim como propostas de intervenção junto aos reservatórios domésticos como: uso de coleiras impregnadas por inseticidas a base de piretróides, tratamentos quimioterápicos e vacinas. Nesse contexto, um grupo de pesquisadores, pertencentes a diferentes unidades da UFMG, desde o ano de 1999, avaliam novos medicamentos e novas formulações para os medicamentos contra as leishmanioses, em diferentes modelos experimentais. Em conjunto, a linha de pesquisa de nosso laboratório está fundamentada no estudo da interação *Leishmania*-macrófagos peritoneais caninos, *in vitro*, assim como avaliação da expressão desses receptores da família das β 2-integrinas em monócitos, macrófagos peritoneais e teciduais.

Desta forma, torna-se importante avaliar o impacto do tratamento utilizando formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associação ao alopurinol, na expressão de receptores de superfície de monócitos em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, bem como a frequência de linfócitos TCD4 e TCD8 no sangue periférico, somado às avaliações clínica e histopatológica. Portanto, a proposta do atual trabalho se justifica, pois além do cão ser bom modelo de estudo da doença LV, o conhecimento da resposta clínica, imunológica e histopatológica desses, após o tratamento quimioterápico, é relevante.

4.0 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5.0 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da associação terapêutica de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos e alopurinol em parâmetros imunológicos, histológicos e parasitológicos em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

5.1 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão dos receptores do tipo TLR-2; CD11b/CD18 (CR3); CD14; MHC de classe II; antígenos CD4 e CD8 em células mononucleares do sangue periférico, antes do início do tratamento (T0) e aos 60 (T60), 140 (T140) e 200 (T200) dias após o início do tratamento.
- Avaliação anatomopatológica de fragmentos de pele obtidos da face interna da pina direita, antes do início do tratamento (T0) e aos 140 (T140) e 201 (T201) dias após o início do tratamento.
- Avaliar qualitativamente a presença formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, em fragmentos de pele obtidos da face interna da pina direita, antes do início do tratamento (T0) e aos 60 (T60), 140 (T140) e 201 (T201) dias após o início do tratamento.
- Avaliação anatomopatológica e parasitológica do fígado, baço, linfonodos cervical superficial aos 201 (T201) dias após o início do tratamento.

6.0 METODOLOGIA

6.1. Animais

Foram utilizados, inicialmente, cinquenta e dois cães, sem raça e idade definidas, de ambos os gêneros provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ribeirão das Neves, Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, sendo esses previamente diagnosticados com leishmaniose visceral pelos testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI - Kit Biomanguinhos[®]) e destinados a eutanásia.

Antes de iniciado os procedimentos referentes à metodologia experimental, o projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), sendo aprovado com número de processo nº 211/2007 (ANEXO 1).

Durante o período de quarentena, todos os cães foram submetidos a novos exames sorológicos: RIFI e ensaio imunoenzimático (ELISA), empregando o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. Esses foram realizados no *Laboratório de Sorologia*, do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Exame parasitológico, PCR convencional de aspirado de medula óssea, foi realizado no Laboratório de Biologia de *Leishmania*, do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG). Quando da positividade em todos os inquéritos realizados esses cães foram classificados como naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Os cães foram submetidos a exame clínico detalhado e os dados foram anotados em fichas individuais (ANEXO 2). Para melhor identificação, cada cão recebeu implante subcutâneo, na região dorsal, de transponder (ISO, FDX-B, 134,2 KHz) compatível com as normas ISO 11784, 11785 e NBR 14766, encapsulado em biovidro 8625, com dimensões de 2,2 mm x 12,2 mm (modelo AT01, Animall Tag[®], São Carlos, SP) próximo à região do músculo trapézio cervical. A leitora utilizada foi do modelo AT01 (Animall Tag[®], São Carlos, SP). O transponder foi implantado com aplicador descartável acoplado a agulha esterilizada de 2,6 mm de diâmetro, 2,2 mm (*furo*) e 32 mm de comprimento. Para a realização do procedimento, os animais foram sedados com 1,0mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (2%) (Anesedan[®], Vetbrands, Brasil) e 10mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (10%) (Ketamina Agener[®], Agener União, Brasil), por via intramuscular; sendo realizada assepsia prévia com tintura de iodo a 20%. O tempo necessário para a execução desse procedimento foi aferido em segundos.

Quando da primeira avaliação clínica (T0), todos os cães foram classificados clinicamente como sintomáticos por apresentarem pelo menos um sinal sugestivo da doença. Os principais sinais clínicos pesquisados, para essa classificação, foram: linfadenopatia local ou generalizada, alopecia local ou generalizada, hiperkeratose, onicogrifose, dermatite, condição corporal abaixo da esperada, úlceras na pele e lesões oculares.

6.1.2. *Manuseio dos animais*

Os cães foram mantidos no canil do Departamento de Parasitologia (ICB/ UFMG), onde receberam água e alimentação industrializada *ad libitum*. Esses foram distribuídos em baias coletivas, respeitando a lotação de cinco animais/baia, sendo essas diariamente higienizadas com hipoclorito de sódio a 1%. Com o objetivo de se obter grupos experimentais mais homogêneos, os animais foram estratificados de acordo com o gênero e porte físico.

Durante o período de “quarentena”, cada cão recebeu uma dose de vacina sêxtupla Vanguard[®] e uma dose de vacina anti-rábica Defensor[®] (Pfizer[®], Brasil), bem como medicação anti-helmíntica oral de amplo espectro com pamoato de pirantel (144mg), praziquantel (50mg) e febantel (660mg) para cada dez quilos de peso (Helfine cães[®], Agener União, Brasil) em dose única. Estes permaneceram no canil por um período de acompanhamento de 201 dias, sendo que, obrigatoriamente todos os procedimentos pertinentes ao estudo foram conduzidos nas dependências do canil.

6.2 - Sínteses dos Fármacos

6.2.1 – *Antimoniato de meglumina*

A síntese do antimoniato de meglumina (AM) foi realizada no Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/ UFMG, pelo professor Raul Rio Ribeiro, sob supervisão do professor Frédéric Jean Georges Frézard, e de acordo com metodologia descrita por Demicheli et al. (2003). Foram utilizadas quantidades equimolares de N-metil-D-glucamina e pentacloreto de antimônio (Sigma Aldrich Inc., EUA). Após precipitação em água destilada e posterior

centrifugação, o precipitado formado a partir do pentacloreto de antimônio foi colhido em béquer de 2L de capacidade com água destilada. Acrescentou-se a esse precipitado, N-metil-D-glucamina em pó, na relação molar antimoniato pentavalente (Sb^{5+}) : N-metil-D-glucamina de 1/1, e a mistura resultante foi mantida sob agitação a 60°C em pH7, até se tornar límpida, quando foi adicionado um volume de acetona (Merck, Alemanha) correspondente a três vezes o volume da mistura inicial. A preparação permaneceu em temperatura ambiente por 24h para decantar, descartando-se o sobrenadante ao final deste período. O precipitado foi retomado com acetona e colocado para secagem, à temperatura ambiente, por três dias. O composto produzido foi submetido à dosagem de Sb^{5+} por espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (AA600, Perkin Elmer) no Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados (Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG), sendo caracterizado quimicamente como AM e com teor de Sb^{5+} de 28% (m/m).

6.2.2 – Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossoma nanométrico

A produção de lipossomas foi realizada de acordo com metodologia descrita por Schetinni et al. (2006) com modificações. Lipossomas liofilizados vazios do tipo SUV (vesículas unilamelares pequenas), também chamados de “freeze-dried empty liposomes” (Frézard et al., 2000), foram formados a partir da composição lipídica que se segue: diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) (Lipoid, Alemanha), colesterol (CHOL) e dicetilfosfato (DCP) (Sigma Aldrich Inc., EUA), utilizando a razão molar de 5:4:1 e concentração final de lipídeo de 55g/L. Foi adicionada à suspensão de SUV, sacarose na relação de 3g de açúcar por g

de lipídeo, como criopreservante (Zadi e Gregoriadis, 2000). Após a adição de sacarose foi realizado o congelamento dos lipossomas em nitrogênio líquido e subsequente liofilização durante 72h (Liofilizador modelo FreeZone 4.5, Labconco Corp., EUA).

Os lipossomas liofilizados foram reidratados em solução de AM (80g de Sb^{5+} /L de água destilada) na razão Sb^{5+} /Lipídeo de 0,58:1 m/m para administração nos animais experimentais. Esta mistura permaneceu incubada a 55°C, durante 30min, e foi adicionada solução salina tamponada (PBS: NaCl 150mM, fosfato 10mM, pH 7.2), em volume igual ao utilizado de solução de AM. Ocorreu nova incubação por 30min a 55°C. O AM encapsulado em lipossoma foi separado daquele não encapsulado por centrifugação por 30min a 25.000g (Centrífuga Jouan MR 23i, St-Herblain, França). O sedimento, formado pelo AM encapsulado em lipossoma, foi lavado duas vezes com solução salina estéril (Solução de NaCl 0,9% Sanobiol, Laboratório Sanobiol LTDA., Brasil). Desta suspensão foram retiradas alíquotas que foram utilizadas para a determinação da taxa de encapsulação de Sb, por meio de espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (AA 6000, Perkin Elmer, EUA). Outras alíquotas foram usadas para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas de lipossomas na suspensão, por meio de espectroscopia de correlação de fótons, com um ângulo de espalhamento de 90°, usando um analisador de partículas (Malvern Zetasizer 3000, Malvern Instruments LTD, Reino Unido). Assim, o diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas foi de 350 ± 58 nm com um índice de polidispersão de 0.30 ± 0.07 (Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, UK). Por fim, o sedimento

foi ressuspenso em solução salina estéril em volume suficiente para a obtenção de uma concentração final de Sb^{5+} de 10g/L.

6.2.3 – Lipossoma na ausência de Sb^{5+} - Lipossoma “vazio”

Os lipossomas liofilizados foram reidratados na ausência de Sb^{5+} , de acordo com protocolo acima descrito, utilizando-se para isso solução de N-metil-D-glucamina em pH7. Esses lipossomas são chamados de “lipossomas vazios” e possuem diâmetro hidrodinâmico médio semelhante ao do lipossoma contendo AM.

6.2.4 – Alopurinol

O alopurinol utilizado neste trabalho foi adquirido de um laboratório de manipulação de medicamentos veterinários (Vetfarma, Brasil) e a forma de apresentação foram frascos contendo 140 cápsulas gelatinosas em concentração de 20mg/ kg de peso vivo, de acordo com o peso individual dos cães que pertenciam aos grupos em que seria administrado o alopurinol durante o período experimental.

6.2.5 – Protocolos de tratamento

Após a identificação inicial dos animais, foi realizada a distribuição dos cães em cada grupo experimental. Esta distribuição foi aleatória, por meio de

sorteio. Os grupos formados foram submetidos aos protocolos de tratamento descritos abaixo:

GRUPOS I e II

Oito cães em cada grupo que receberam, a cada 96h, uma aplicação por via endovenosa lenta, de antimoniato de meglumina (AM) encapsulado em lipossoma nanométrico, em dose equivalente a 6,5mg de Sb⁵⁺/kg p.v., totalizando seis aplicações.

GRUPOS III e IV

Oito cães em cada grupo que receberam, a cada 96h, uma aplicação por via endovenosa lenta de lipossomas nominados “lipossoma vazio”, pela substituição do AM por solução de N-metil-D-glucamina em pH 7.0, totalizando seis aplicações.

GRUPOS V e VI

Oito cães em cada grupo que receberam, a cada 96h, uma aplicação por via endovenosa lenta, de um volume de solução fisiológica correspondente ao volume/kg p.v. da solução de AM encapsulado em lipossomas nanométricos, calculado para o grupo I, totalizando seis aplicações.

No dia da aplicação do AM encapsulado em lipossoma nanométrico, *nominado dia 1*, os animais dos grupos II, IV e V receberam, por via oral, alopurinol na dose de 20mg/kg p.v., *s.i.d.*, por 140 dias. A partir do dia 141 foi interrompido o uso do alopurinol. Todos os animais permaneceram no canil por mais 60 dias, totalizando um período de acompanhamento de 201 dias.

O grupo VI permaneceu como controle da infecção, para avaliação da capacidade de cada protocolo intervir na evolução da doença no animal (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos 52 animais nos grupos experimentais, após sorteio, de acordo com o gênero e peso médio.

Grupo	Protocolo	N° de cães	Machos	Fêmeas	Peso médio (kg)
I (Ant)	AM encapsulado em lipossomas nanométricos	8	4	4	9,72 ± 3,89
II (Ant + Alo)	AM encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol	8	3	5	9,38 ± 2,08
III (Lip V)	Lipossomas “vazios”	8	6	2	8,12 ± 2,87
IV (LipV + Alo)	Lipossomas “vazios” + Alopurinol	8	7	1	8,77 ± 1,91
V (Alo)	Alopurinol	8	5	3	19,78 ± 3,57
VI (C)	Controle	12	7	5	15,95 ± 3,22

6.3 Colheita e preparação de material para análise

Para a coleta dos materiais propostos pelo estudo todos os animais foram anestesiados com associação de 1,0mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (2%) (Anesedan[®], Vetbrands, Brasil) e 10mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (10%) (Ketamina Agener[®], Agener União, Brasil), por via intramuscular. Cinco minutos após a indução anestésica foi administrado 0,5mg/Kg de diazepam (ampolas de 10 mg/ 2 mL) (Diazepan[®], União Química, Farmacêutica Nacional S/A, Brasil) por via endovenosa, administradas em *bolus*.

6.3.1. Coleta de amostra de sangue e soro

Vinte e cinco mililitros de amostras de sangue periférico foram coletados, de cada cão (n= 52), por venopunção da jugular após tricotomia e anti-sepsia local, através de seringas 10cc acopladas a agulha estéril 21G1 (0,80mm x 25mm). Posteriormente, 10 ml de sangue foram transferidos para tubos contendo o composto orgânico quelante ácido etilenodiamino tetra-acético (K3EDTA) para a realização da técnica de citometria de fluxo, sendo que, a amostra de plasma foi coletada e armazenada a -20°C para dosagem de óxido nítrico (NO).

Dez mililitros de sangue foram divididos em tubos, com e sem anticoagulante, e enviados para o Laboratório de Diagnóstico TECSA Pet (Belo Horizonte, MG, Brasil) para análises hematológicas e bioquímicas, respectivamente. O perfil hematológico, de todos os cães, foi obtido pela realização de hemograma completo. As investigações bioquímicas consistiram

das seguintes análises: provas de função hepática, avaliada por meio da determinação sérica de fosfatase alcalina (FA), alamina amino-transferase (ALT) e aspartato amino-transferase (AST), além da avaliação das concentrações de albumina; prova de função renal, avaliada pelas determinações séricas de uréia e de creatinina e finalmente, dosagem de proteínas totais, dosagem de globulina, a qual possibilitou o estabelecimento da razão albumina/ globulina. Os valores de referência adotados, para a avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, estão descritos nos ANEXOS 3 e 4.

Amostras de sangue, sem anticoagulante, foram obtidas e encaminhadas ao laboratório de sorologia do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG), para a realização dos ensaios sorológicos - RIFI e ELISA.

6.4. Obtenção e análise dos dados por citometria de fluxo

Como descrito anteriormente, 10 ml de sangue foram coletados através de venopunção da jugular, transferidos para tubos contendo K3EDTA, para a realização da técnica de citometria de fluxo para a imunofenotipagem das células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Para isolar as PBMC dos cães infectados, o sangue foi gentilmente sobreposto em Ficoll-Hypaque (Histopaque[®] 1,077 - Sigma, EUA) na proporção de 1 Ficoll : 2 sangue (1/2) e centrifugado (300 xg, 40 min, 14°C). O anel de células mononucleares formados na interface ficoll/ plasma foi coletado e transferido para outro tubo estéril. O volume foi ajustado para 15 ml com PBS-W (0,15M; 8g/L de NaCl; 2g/L de KCl; 2g/L de KH₂PO₄ e 1.15g/L de Na₂HPO₄, pH 7,2 com 0,5%p.v de albumina bovina sérica, InLab[®], e 0,1 Na₃N%) e centrifugado a 300xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 5 ml de solução de lise (8,29g de NH₄Cl; 1g de KHCO₃; 37,2mg Na₂EDTA; 800 ml H₂O milli-Q; pH 7,2) foi adicionado ao sedimento, seguido de incubação por cinco minutos em temperatura ambiente. O volume foi ajustado para 15 ml com PBS-W seguindo nova centrifugação e lavagem com PBS-W. Finalmente, após descarte do sobrenadante, adicionou-se 1 ml PBS-W, sendo a concentração ajustada para 1×10^7 células/ ml. Em placas de 96 poços com fundo em "U" (Biomedicals Limbro[®], Aurora, OH, EUA) foram adicionados 20µl da suspensão de leucócitos, sendo esses incubados a 4°C por 30min no escuro e na presença de 20µl de anticorpos monoclonais (mAbs), de superfície, diluídos a seu título em PBS (Tabela 2). Anticorpos, não marcados previamente, foram conjugados usando o kit Zenon tricolor (Molecular Probes - Z- 25080),

conforme descrito pelo fabricante; sendo utilizados os fluorocromos: FITC (Isotiocianato de fluoresceína – mensurada a 530 ± 30 nm), R-PE (Ficoeritrina – mensurada a 585 ± 26 nm) e/ ou PE-Cy-5.5 (Ficoeritrina conjugada com cianina — mensurada acima de 630 nm). Isso nos permitiu utilizar marcações duplas ou triplas por tubo.

Após o período referente à incubação, as placas foram lavadas com Na_3N 0,1% em PBS, fixadas com 200 μl de formaldeído a 2% em PBS, transferidas para tubos próprios de leitura, sendo mantidas a 4°C até que se procedesse à aquisição dos dados no citômetro de fluxo (FACSVantage, Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA).

Tabela 2: Pannel de Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular.

Anticorpos monoclonais	Isotipo	Clone	Fluorocromo	Diluição	Célula alvo
Anti-CD11b canino	mouse IgG1	MCA 1777S (AbD Serotec)	FITC*	1/30	Leucócitos
Anti-CD14 canino	mouse IgG1	61D3 (SourthernBiotech)	PE-Cy5.5	1/50	Monócitos
Anti-MHC II canino	mouse IgG1	MCA2037S (Serotec)	PE*	1/20	Células mononucleadas
Anti- CD4 canino	mouse IgG1	MCA1038PE (AbD Serotec)	Cy*	1/40	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8 canino	mouse IgG1	MCA1039F (AbD Serotec)	PE	1/40	Linfócitos T supressores e/ ou citotóxicos
Anti - TLR-2 humano	Mouse IgG2a	2B4A1 (SourthenBiotech)	PE	1/20	Leucócitos
Mouse IgG2a Isotype control	mouse IgG _{2a} λ	HOPC-1 (IMGENEX)	PE	1/20	Inespecífico
Mouse IgG1 Isotype control	Mouse IgG1	MOPC-31C(SourthenBiotech)	FITC*/PE*/Cy*	1/40	Inespecífico

* anticorpos marcados com Kit Zenon Tricolor.

6.4.1. Obtenção e análise dos dados no citômetro de fluxo

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSVantage, (Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA) o qual é equipado com laser de argônio que possibilita a emissão de comprimentos de ondas de 488nm. Esse tipo de laser possibilita a excitação dos fluorocromos: FITC, PE e PE/CY5.5, sendo que, sua detecção foi feita em escala logarítmica. A difração (forward scatter – FSC) e refração/ reflexão (side scatter – SSC) do raio laser possibilitam, sem a necessidade de um fluorocromo, a caracterização de aspectos morfométricos das células como: tamanho e granulosidade/ complexidade interna, respectivamente; sendo que, sua mensuração foi feita em escala linear.

Durante a fase do experimento nominada *aquisição* utilizou-se, inicialmente, um gráfico de dispersão lateral (SSC) *versus* dispersão frontal (FSC) de luz para identificação das populações de leucócitos. A partir disso, foi possível estabelecer a região R1 de células mononucleares, caracterizadas por tamanho intermediário e baixa granulosidade para os monócitos e dimensão reduzida com ausência de granulosidade para os linfócitos. A partir desse R1 foram criados três outros gráficos de pontos “Dotplot” utilizando a combinação simples dos três fluorocromos utilizado no experimento (FITC, PE e PE/CY5.5). Para cada amostra, foram adquiridos 50.000 eventos que correspondem a 50.000 células, uma vez que um evento significa uma célula.

Os dados obtidos foram avaliados usando o programa de análises FlowJo® (Three Star. Inc., Ashland, OR, EUA).

Inicialmente, para a avaliação dos monócitos, foram utilizados aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição de pontos. Nesses, os dados correspondentes à dispersão lateral da luz (SSC) foram posicionados no eixo da ordenada, ao passo que, a imunomarcagem CD14/FL3 foi posicionada no eixo correspondente à abcissa. Isso possibilitou a identificação da população de monócitos como células SSC^{intermediario} CD14^{high} (Figura 1A), minimizando assim a contaminação da região selecionada por linfócitos e neutrófilos. Em seguida, nessa população de monócitos previamente selecionada, foram determinadas a intensidade de fluorescência média (IFM) dos imunomarcadores CD11b/CD18, MHCII e TLR-2 através da construção de histogramas, como exemplificado na Figura 1B. O perfil fornecido pela emissão das fluorescências, nas células marcadas, foi também delimitado em quadrantes, obtendo-se quatro divisões acompanhadas de uma análise quantitativa dos dados. Esta análise é fundamentada na percentagem de células marcadas com cada tipo de fluorescência, sendo que, o ponto de corte para avaliação dessa população foi feito a partir do controle de isotipo (Figura 1C).

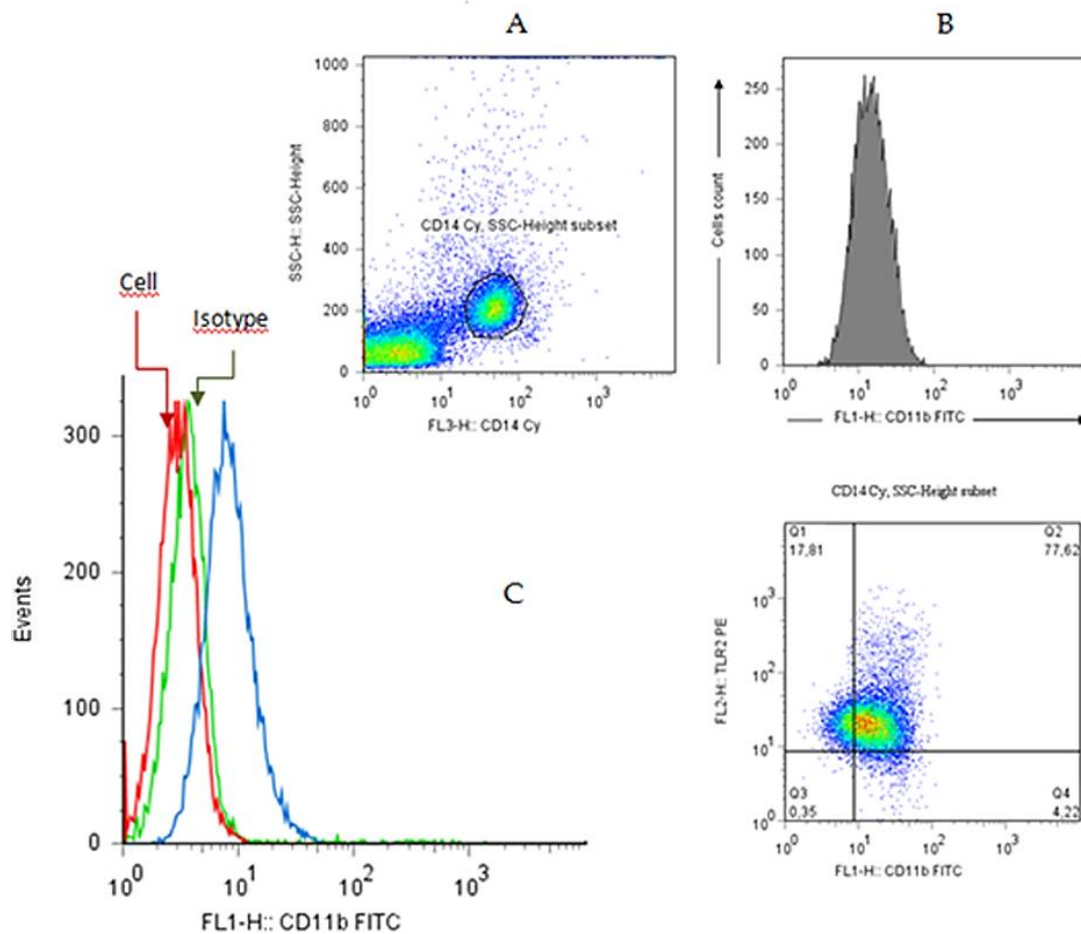


Figura 1: Sequência representativa da estratégia de análise de monócitos obtidos do sangue periférico (PBMC). O gráfico A mostra a dispersão lateral da luz (SSC) (eixo das ordenadas) *versus* a expressão de CD14 (eixo das abcissas), com seleção da região de interesse. O gráfico B mostra a distribuição unimodal do marcador, na população de monócitos previamente selecionados. O gráfico C mostra uma população de monócitos (CD14⁺) previamente selecionados, que apresentam marcação para CD11b e TLR-2, sendo que o estabelecimento da população, duplamente marcada, foi feito levando-se em consideração o ponto de corte estabelecido pela célula e pelo controle de isotipo correspondente.

Para a avaliação da população de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, procedemos, inicialmente, com a seleção da população de linfócitos a partir de critérios morfométricos. Assim, a seleção da região R1 (linfócitos) foi feita em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) o que possibilitou a seleção da população celular de interesse – linfócitos apresentando-se como FSC^{Low}SSC^{Low} (Figura 2A). Em seguida, foram construídos gráficos de pontos “DotPlot” FL2/CD8 *versus* FL3/CD4, permitindo a identificação de 2 subpopulações de interesse: CD4⁺CD8⁻ e CD4⁻CD8⁺

(Figura 2B). Finalmente, dentro de cada população positiva para seu marcador, foi determinado a IFM de CD4 e CD8, com a construção de gráficos do tipo histograma (Figura 2C).

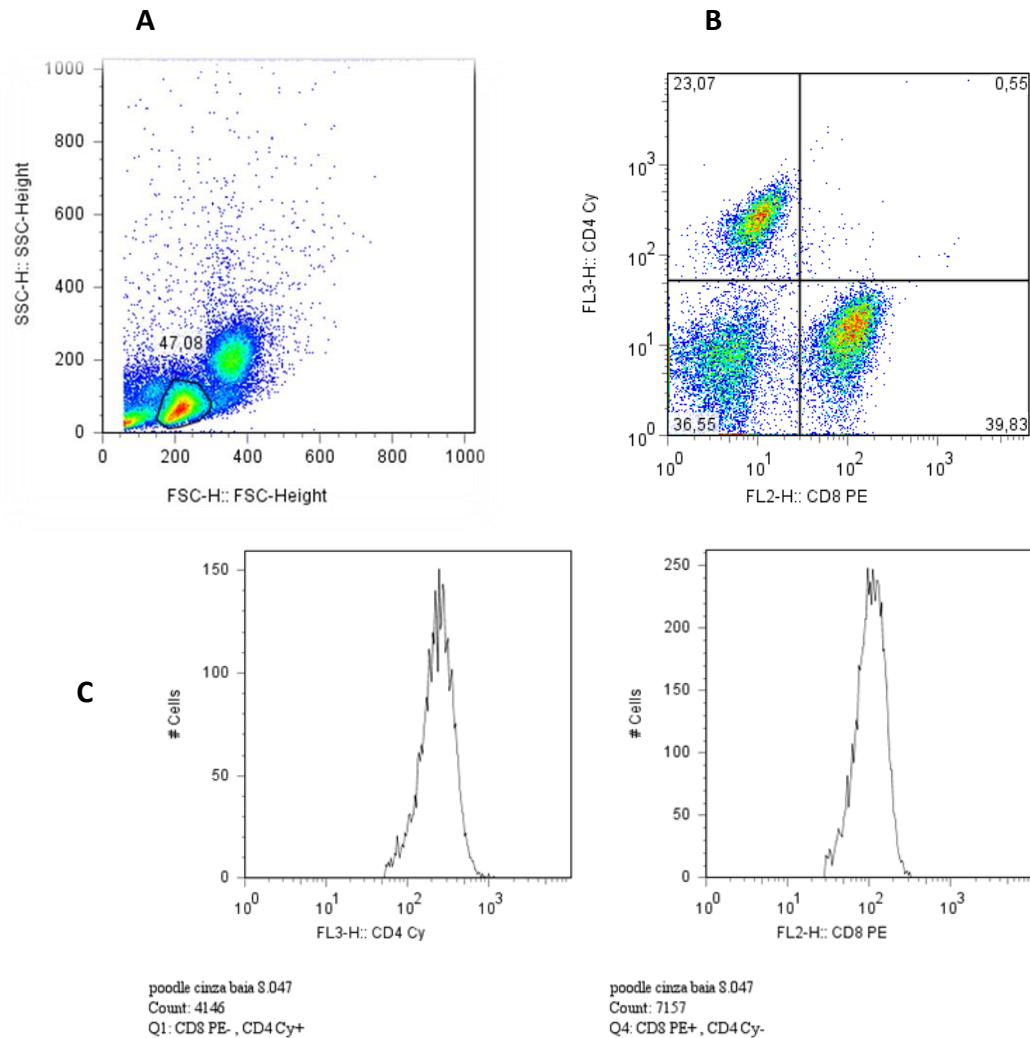


Figura 2: O gráfico A mostra a seleção da região R1, em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) baseada em aspectos morfológicos da população celular de interesse. Os linfócitos apresentando-se como $FSC^{Low}SSC^{Low}$. O gráfico de pontos B mostra no quadrante superior esquerdo (Q1) a população positiva para CD4 e negativa para CD8, no quadrante superior direito (Q2) a população duplamente positiva para CD4 e CD8, no quadrante inferior direito (Q3) a população positiva para CD8 e negativa para CD4 e no quadrante inferior esquerdo (Q4) a população duplamente negativa para ambos os marcadores. O gráfico C e D mostram a distribuição unimodal do marcador CD4 e CD8, respectivamente, na população de linfócitos previamente selecionados.

6.5. Exames parasitológicos

6.5.1 Obtenção e preparo das biópsias obtidas da face interna da pina direita

Biópsias de pele, obtidas da face interna da pina direita, foram coletadas de todos os animais com o auxílio de um “punch” de cinco milímetros de diâmetro (Punch para biópsia[®], Kolplast ci LTDA, Brasil) nos períodos de T0, T60, T140 e T201, sendo que, todas foram retiradas de área não lesionada. Posteriormente, cada fragmento obtido foi seco em papel filtro e imediatamente fixado em solução de formalina tamponada a 10%, pH 7,2, sendo mantidos sob fixação por até 48h. Após essa etapa, as amostras já fixadas foram processadas em equipamento histotécnico automático seguindo-se das etapas de: desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos de parafina, contendo os fragmentos, foram cortados em micrótomo na espessura de 3 µm e montados em lâminas previamente desengorduradas, com álcool-éter, e em lâminas, também desengorduradas, mas que foram banhadas em solução gelatinosa de fixação – ANEXO 5. Em cada uma das lâminas foram colocados três cortes. Posteriormente, esses cortes foram corados pelas técnicas rotineiras de Hematoxilina e Eosina (H&E) (ANEXO 6), para análise das alterações histológicas e foram submetidos ao método imuno-histoquímico (IHQ) da Estreptoavidina-biotina-peroxidase (Tafari et al., 2004), para a visualização das formas amastigotas.

6.5.2 Imunoistoquímica – Técnica da estreptoavidina - peroxidase para detecção de formas amastigotas

As lâminas gelatinizadas, contendo cortes parafinados de tecidos, foram desparafinadas em xilol por 30min, hidratadas em solução de álcoois decrescentes (álcool absoluto, 90°, 80° e 70°, respectivamente), por 3min, e submetidas a um banho em PBS (Solução de Tampão Fosfato - pH 7,2, 0,01M). Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes diluídos a 4% em PBS), por 30min à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram submersas em solução de bloqueio (12g de leite em pó desnatado diluído em 200 ml PBS) e incubadas por 30 min à temperatura ambiente. Logo após, o anticorpo primário, soro de cão infectado com *L. chagasi*, na diluição de 1/100 em BSA-soro albumina (0,01%), foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 24 horas em câmara úmida a 4° C. Adicionou-se então o anticorpo secundário biotilado (anti-soro de coelho biotilado anti-camundongo IgG1- Peroxidase- K0675 -DAKO- LSAB 2 System, EUA), sendo as lâminas novamente incubadas em câmara úmida por 30min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o complexo estreptoavidina peroxidase e incubou-se por 30min, em câmara úmida, à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de diaminobenzina (DAB) a 0,024% em PBS, acrescida de solução de peróxido de hidrogênio (30 volumes a 0,16% em PBS), por 5min à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente por 30min. As lâminas foram então desidratadas em álcoois crescentes, diafanizadas em xilol

e montadas utilizando o meio de montagem rápida entellan[®] (Entellan[®], 107960 - Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle positivo. Com o intuito de potencializar o diagnóstico, todos os campos da lâmina foram examinados com objetiva de 40X.

6.6. Protocolo de eutanásia

A eutanásia dos animais ocorreu 201 dias após o início do tratamento e cumpriu a Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que *Dispõe sobre os Procedimentos e Métodos de Eutanásia em Animais e dá outras providências*.

Assim, foram administrados 1,0 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (2%) (Anesedan[®], Vetbrands, Brasil) associado a 10mg/kg de Cloridrato de Cetamina (10%) (Ketamina Agener[®], Agener União, Brasil) e por via intramuscular. Após, foi administrado 20mg/kg de p.v. de tiopental sódico (Thiopentax[®] 1g, Cristália, Brasil) até obtenção do estado de anestesia geral, com subsequente aplicação, por via endovenosa, de uma associação de embutamida, mebenzônio e tetracaína (T-61[®], Invervet Schering-Plough Animal Health, EUA) na dose letal de 0,33 ml/kg de p.v., para a obtenção de parada cardiorrespiratória.

6.7. Avaliação anatomopatológica e parasitológica dos órgãos

6.7.1 – Histopatologia

Durante o exame necroscópico foi feito, inicialmente, a avaliação macroscópica, à vista desarmada, dos linfonodos cervical superficial, baço e fígado, com posterior pesagem (em balança de precisão) para determinação dos pesos relativos. Todas as observações relevantes foram anotadas em fichas individuais de necrópsia (ANEXO 7).

Os fragmentos de órgãos, obtidos durante a necropsia, foram fixados em formalina tamponada a 10%, pH7,2, e submetidos às preparações rotineiras para análise histopatológica e parasitológica como descrito no item 6.5.1 e 6.5.2. A principal finalidade da avaliação histopatológica foi a de avaliar a integridade tecidual dos fragmentos representativos dos órgãos relevantes – pele, linfonodo cervical superficial, baço, fígado - associada às principais alterações histopatológicas (Tabela 3).

Tabela 3: Principais alterações histopatológicas avaliadas na pele, nos linfonodos cervical superficial, baço e fígado.

Alterações histopatológicas avaliadas	
Pele de orelha	Úlcera; hiperkeratose superficial e folicular; ortokeratose; acantose; parakeratose; degeneração hidrópica e hialina; necrose; granulomas e células gigantes; inflamação; papilomatose e espongirose.
Linfonodo cervical superficial	Espessamento e inflamação da cápsula; inflamação dos seios subcapsulares; hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfoides e dos macrófagos, congestão e presença de hemossiderina.
Baço	Espessamento e inflamação da cápsula; hiperplasia e hipertrofia da polpa branca e da polpa vermelha; depleção de áreas T dependentes na polpa branca; congestão e deposição de hemossiderina.
Fígado	Espessamento e inflamação da cápsula; fenômenos degenerativos; inflamação portal; granulomas; hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer; congestão sinusoidal e deposição de hemossiderina.

Essas alterações foram classificadas de forma semi-quantitativa, levando em consideração a intensidade de acometimento dos fragmentos avaliados, que variou de: **Discreta** - quando menos de 25% do fragmento se apresentava acometido; **Moderada** - quando até 50% do fragmento se apresentava acometido e em **Acentuada** - quando mais de 50% do fragmento apresentava-se acometido. Para maximizar os resultados, todos os campos do corte foram examinados com objetiva de 40X.

Quanto ao cálculo final do peso relativo dos órgãos, esse foi realizado, para cada animal, dividindo-se o peso de cada órgão (em gramas), pelo peso corporal de cada animal (em gramas), obtidos no dia da necropsia. Posteriormente, essa razão foi multiplicada por 100. O resultado foi então expresso em gramas/100g de peso vivo (g/100g p.v).

6.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, de acordo com a natureza dos dados, pelos testes que mais se aplicaram a cada caso, com o auxílio dos programas de pacotes estatísticos GraphPad[®] InStat 5 (GraphPad Software Inc, EUA). Todos os resultados, relacionados à citometria de fluxo, assumiram distribuição não paramétrica, ou seja, dados que apresentavam um comportamento não Gaussiano, ou distribuição não-normal. Assim, primeiramente, o teste Kruskal-Wallis foi aplicado, seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunn's. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

O teste de Fisher foi utilizado para verificar diferenças entre a proporção de alterações dermatológicas histopatológicas entre os indivíduos de um mesmo grupo aos 140 e aos 201 dias, em relação à proporção obtida antes do tratamento.

7.0 RESULTADOS

7.1 Resultados referentes ao primeiro artigo intitulado:

Toll Receptors Type-2 and CR3 Expression of Canine Monocytes and Its Correlation with Immunohistochemistry and Xenodiagnosis in Visceral Leishmaniasis

O objetivo do trabalho foi avaliar a expressão de TLR-2 em monócitos do sangue periférico de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*, além de avaliar a correlação com a expressão de CD11b/CD18 (CR3) e o potencial de cães como fonte de infecção para o flebotomíneo, usando o xenodiagnóstico. Quarenta e oito cães foram sorologicamente diagnosticados com *L. infantum* através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Exames parasitológicos de aspirado de medula óssea foram positivos pela análise de PCR convencional. Todos os cães foram clinicamente classificados como sintomáticos. Amostras da pele da face interna da pua direita foram obtidas para avaliação da presença de formas amastigotas pela técnica da imunohistoquímica (IHQ). Somado a isso, foi realizada a técnica de xenodiagnóstico (XENO), na mesma região onde se coletou a biópsia de pele, com o intuito de avaliar o potencial destes cães como fonte de infecção para os flebotomíneos. A citometria de fluxo, realizada em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), utilizou anticorpos monoclonais anti-CD14, anti-CD11b, anti-TLR-2 e anti-MHCII.

Como resultados, observamos que houve correlação positiva ($r=0,5373$) entre a positividade parasitária tecidual avaliada pela IHQ e a infectividade junto ao inseto vetor. Cães que apresentavam elevada intensidade média de fluorescência (IMF) para o marcador CD11b, dentro da população de monócitos CD14⁺, foram representados por cães sem carga parasitária no tecido da orelha e que também não foram capazes de infectar flebotomíneos (IHQ⁻/XENO⁻). Ao passo que, aqueles com menor expressão de IMF de CD11b, dentro dos monócitos CD14⁺, foram aqueles em que foi possível evidenciar amastigotas na pele de orelha, conjuntamente à capacidade de infectar flebotomíneos (IHQ⁺/XENO⁺) ($p = 0,0032$). Resultados similares foram obtidos para IMF de MHCII ($p=0,0054$). Além disso, considerando a frequência da população de CD11b⁺TLR-2⁺ e CD11b⁺MHCII⁺, as maiores médias foram observadas nos cães com IHQ⁻/XENO⁻ quando comparados aos cães com IHQ⁺/XENO⁺ ($p=0,01$, $p=0,0048$; respectivamente). Estes dados, juntamente aos resultados dos ensaios de óxido nítrico (NO), que também foram superiores nos cães IHQ⁻/XENO⁻, levam à conclusão de que os cães negativos para as duas avaliações parasitológicas são mais resistentes ou podem modular a resposta imunológica celular essencial para a eliminação da *Leishmania*.

7.2 Resultados relacionados ao protocolo terapêutico

Antes do início do tratamento, cada grupo experimental tratado e o grupo controle eram compostos por oito e doze cães, respectivamente, totalizando inicialmente 52 cães. Ao longo do curso do experimento foram totalizados seis óbitos por motivos de brigas, entre os cães, sendo um representante do grupo antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de tamanho nanométricos (Ant); dois do grupo lipossomas vazios (LipV); dois do grupo antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol (Ant + Alo) e um do grupo controle (C).

Os resultados referentes à avaliação dermatológica dos cães serão apresentados separadamente, considerando sua importância junto aos sinais sugestivos que compõem a LVC conjuntamente à elevada frequência de sua manifestação.

7.3. Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães antes do início do protocolo terapêutico (T0)

Antes do início do tratamento, grande parte dos sinais clínicos, relacionados à LVC, apresentavam-se presentes nos animais que seriam posteriormente alocados, aleatoriamente, nos grupos que receberam os tratamentos preconizados (Gráfico 1).

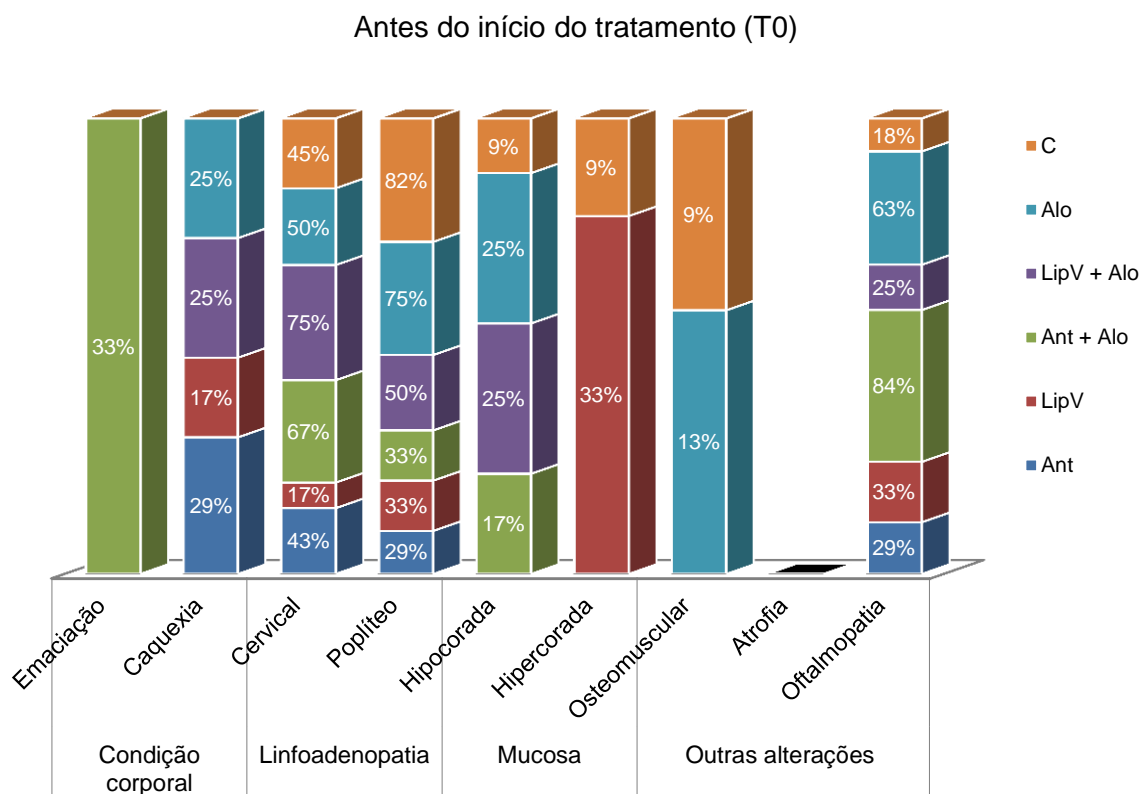


Gráfico 1: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães antes do início do protocolo terapêutico (T0) com antimonio de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol.

7.3.1. Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico

Quando comparamos cada grupo, ao longo do tempo, podemos verificar que para o grupo antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomos nanométricos (Ant) (n=7) a caquexia foi observada em dois cães (28,6%), antes do tratamento (T0); ao passo que, um cão (14,3%) apresentou emaciação em T50. Com relação ao exame das mucosas oculares e oral, essas se apresentaram hipercoradas, em pelo menos um cão (14,3%), até o momento T170. De forma semelhante, observou-se comprometimento oftálmico até o período T170 em um animal (14,3%). Apesar da relativa melhora do quadro de linfadenopatia, de ambos os linfonodos, ao longo das avaliações (T0 a T201), essa alteração continuou presente até o último momento de avaliação (T201) (Gráfico 2).

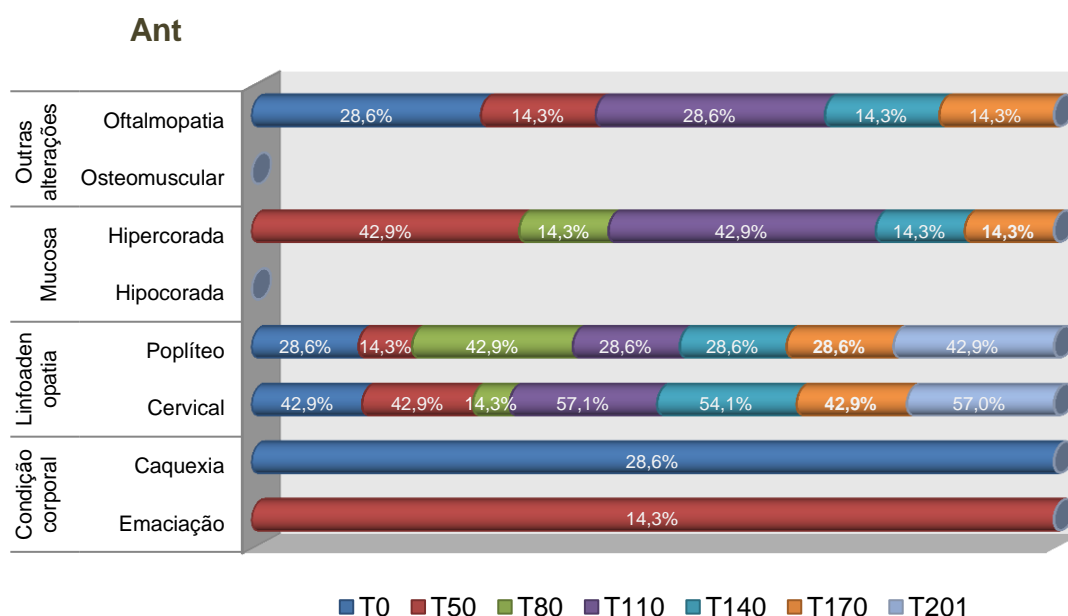


Gráfico 2: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomos nanométricos antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

Quando consideramos o grupo tratado com lipossomas nominados vazios (LipV) (n=6), podemos observar que os sinais clínicos de caquexia, linfadenopatia dos linfonodos cervical superficial e poplíteo, mucosas ocular e oral hipercoradas e comprometimento oftalmológico estiveram presentes tanto no primeiro momento de avaliação (T0) quanto em T201, com aumento da frequência de acometimento para o quadro de linfadenopatia.

Outros sinais clínicos como emaciação e palidez das mucosas oculares e oral se manifestaram ao longo do experimento, mantendo-se presentes até T201 (Gráfico 3).

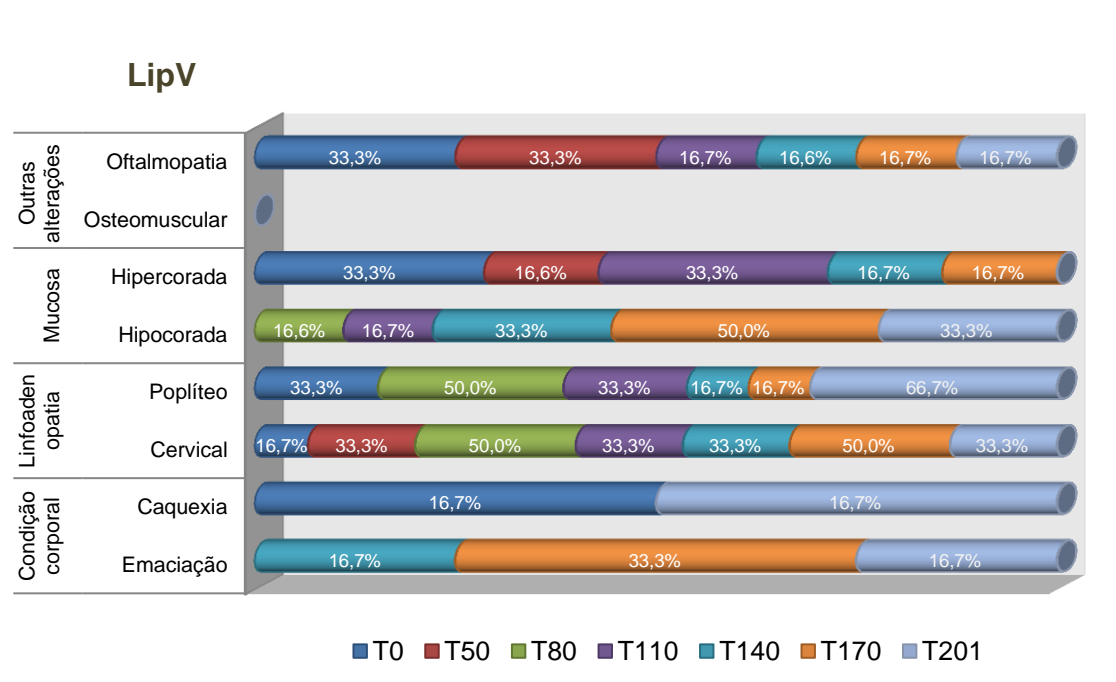


Gráfico 3: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com lipossomas nanométricos vazios antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

Considerando ao grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (Ant + Alo) (n=6), foi observada melhora expressiva em cinco dos seis sinais clínicos inicialmente identificados até os 170 dias após o início do tratamento. Sendo que, dessas alterações, emaciação não foi identificada na primeira avaliação após o início do tratamento (T50), adenopatia do linfonodo poplíteo somente foi identificada até o momento T80 e adenopatia do linfonodo cervical superficial e palidez das mucosas oral e ocular somente foram observadas até 140 dias após o início do tratamento.

O único sinal que se manteve presentes até o último momento de avaliação foi a oftalmopatia. Entretanto, é importante ressaltar que, apenas um animal (16,7%) se encontrava acometido em T201, diferentemente dos cinco animais (83,33%) acometidos antes do início do tratamento (T0) (Gráfico 4).

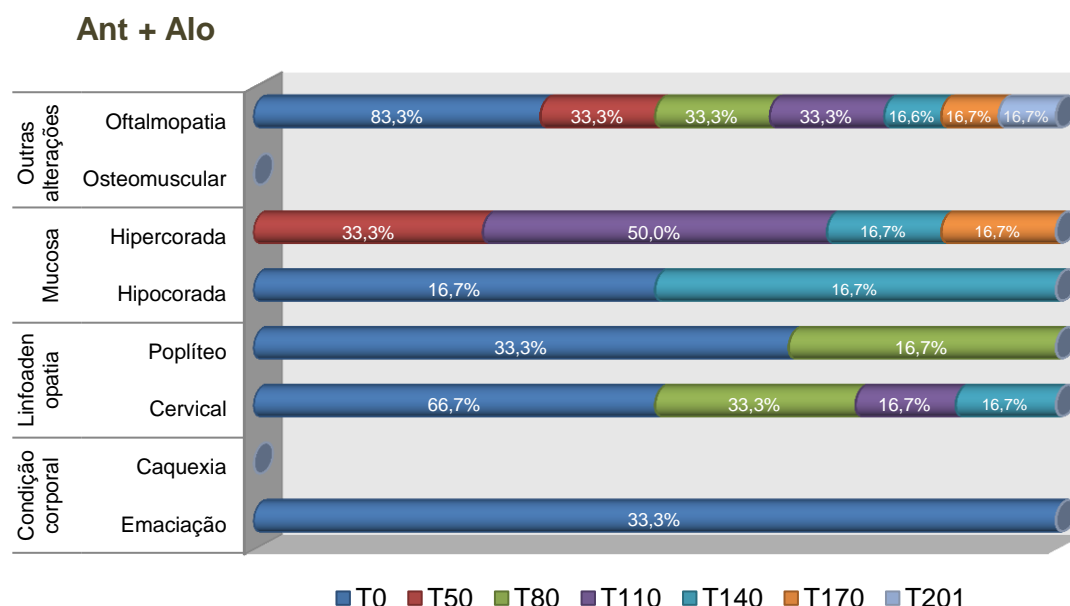


Gráfico 4: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

Quanto ao grupo tratado com lipossomas vazios associados ao alopurinol (Ant + Alo) (n=8), cinco dos oito sinais clínicos investigados foram observados em T0, sendo que desses, três continuaram presentes até T201, com redução da frequência para todos. Os outros dois sinais observados, mucosas hipercoradas e emaciação, se manifestaram após o início do tratamento, mas sofreram remissão completa até o último momento de avaliação (Gráfico 5).

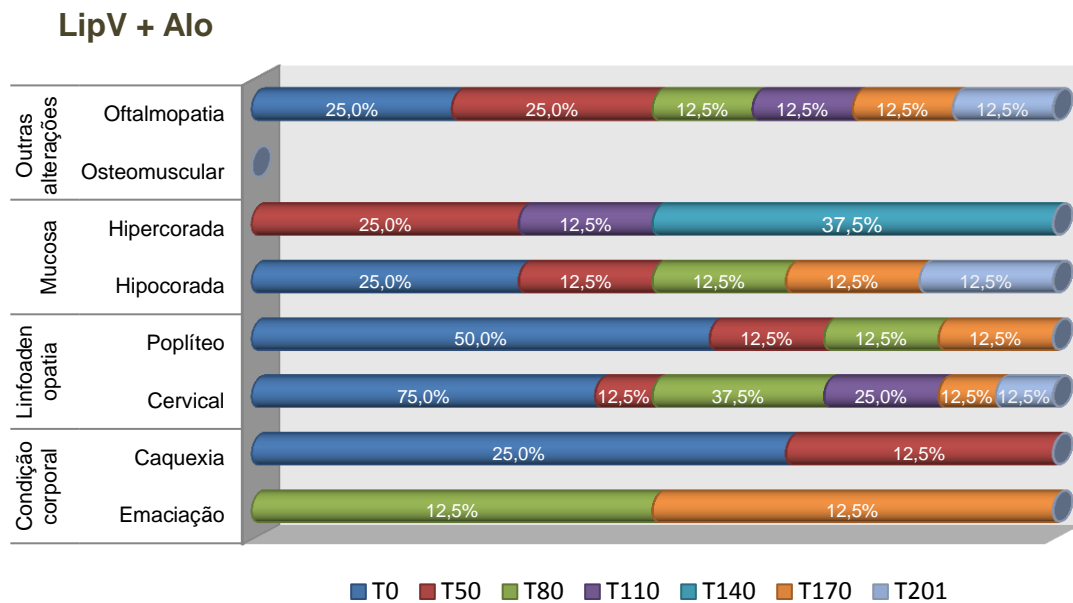


Gráfico 5: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com lipossomas nanométricos vazios associados ao alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

O grupo tratado somente com alopurinol (Alo) (n=8), apresentou expressiva melhora quando consideramos os sinais de caquexia, alteração da coloração das mucosas, comprometimento osteomuscular e oftálmico; uma vez que, na penúltima avaliação (T170), essas alterações não foram mais observadas.

Os únicos sinais clínicos, ainda presentes na última avaliação, foram a linfadenopatia de ambos os linfonodos avaliados. Entretanto, observou-se redução da incidência quando comparamos T201 com T0 (Gráfico 6).

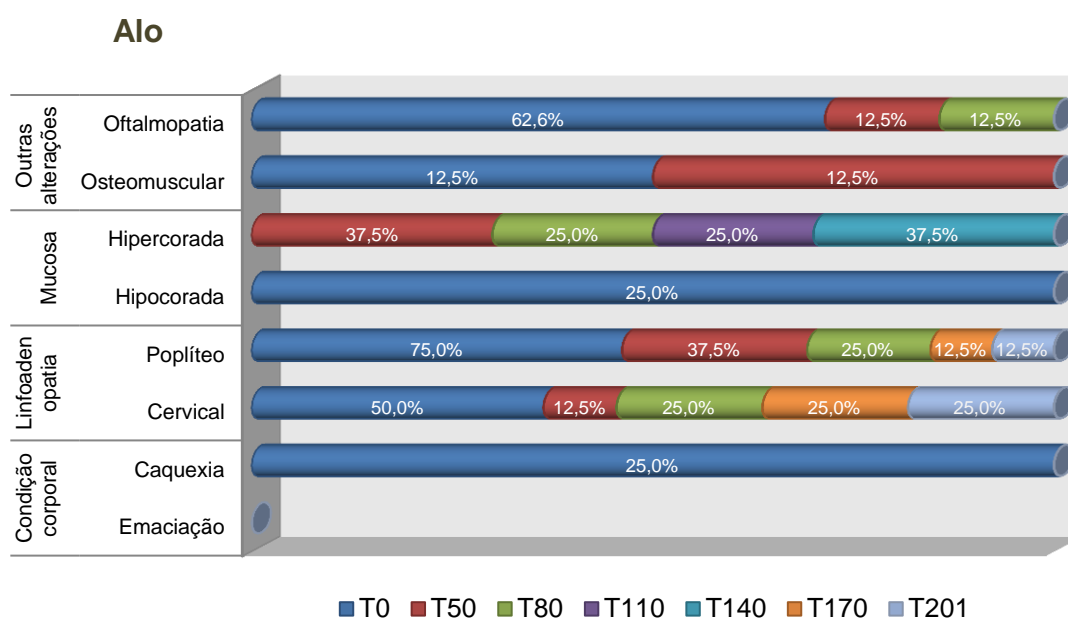


Gráfico 6: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

Quando consideramos o grupo controle (C) (n=11), seis das oito alterações clínicas avaliadas, durante o experimento, permaneceram presentes em pelo menos um animal (9,1%) ao longo de todo o experimento. A comparação entre o último momento de avaliação (T201) e T0, indicou que: três desses sinais - emaciação, adenopatia do linfonodo cervical superficial e oftalmopatia - apresentaram frequência superior em T201; outros três apresentaram frequência similar - alteração da coloração das mucosas e comprometimento osteomuscular - e apenas um sinal apresentou frequência inferior, adenopatia do linfonodo poplíteo (Gráfico 7).

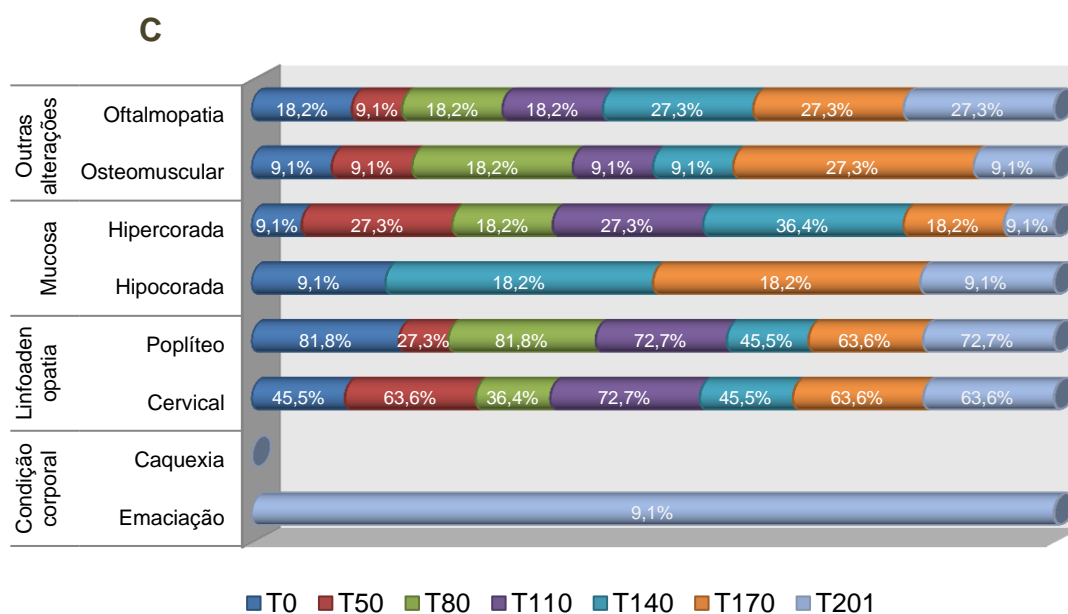


Gráfico 7: Frequência de sinais clínicos relacionados à leishmaniose visceral em cães controle nos momentos das avaliações clínicas (T0, T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

7.4 Citometria de fluxo

Para avaliação dos aspectos imuno-fenotípicos das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram adotadas duas estratégias: a primeira avaliou a frequência da população de interesse, ou seja, “o valor percentual (%)” das células expressando um determinado marcador fenotípico na população celular de interesse, ao passo que, a segunda estratégia avaliou a “intensidade média de fluorescência” (IMF), ou seja, a densidade de expressão de um determinado marcador fenotípico na população celular de interesse.

A primeira abordagem possibilita a quantificação dos fenótipos celulares que apresentam distribuição bimodal, ou seja, fenótipos positivos ou negativos para determinado marcador referente a uma população. Sendo que, em nosso trabalho, foi considerada a frequência percentual da subpopulação celular expressando o marcador fenotípico de interesse. Na segunda abordagem, foi utilizada uma análise semi-quantitativa da expressão de marcadores fenotípicos que possuem distribuição unimodal, ou seja, verificou-se em toda a população celular de interesse a expressão do referido marcador fenotípico. Nesse último tipo de avaliação, deslocamento da população celular ao longo do eixo da IMF caracteriza alterações na densidade de expressão do referido marcador. Nesse caso, os resultados foram expressos como IMF obtida em escala logarítmica.

As análises fenotípicas dos monócitos 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* CD14/FL3.

Avaliação da IMF de CD11b/CD18 na população de monócitos CD14+

A partir dessa seleção inicial, foi avaliada a expressão de CD11b/CD18 (CR3). Assim, o grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de tamanho nanométrico (Ant) apresentou aumento significativo da expressão de CD11b/CD18, na população de monócitos CD14⁺, do momento anterior ao início de tratamento (T0) ($\bar{X} = 11,93 \pm 4,16$) quando comparado a T140 ($\bar{X} = 24,88 \pm 3,28$; $p < 0,0001$). Analisando esse primeiro momento de intervenção, o grupo C (Controle) também apresentou aumento significativo das médias de IMF de T0 ($\bar{X} = 12,14 \pm 3,52$) a T60 ($\bar{X} = 16,94 \pm 1,97$; $p < 0,001$). Contrariamente, os grupos lipossomas “vazios” (LipV); lipossomas “vazios” associados ao alopurinol (LipV + Alo) e alopurinol (Alo) apresentaram variações na expressão de CD11b/CD18, nesse mesmo período avaliado (T0-T140), mas sem diferença estatística entre os tempos.

No tempo T200, os grupos Ant ($\bar{X} = 11,40 \pm 1,82$); LipV ($\bar{X} = 10,78 \pm 1,21$); LipV + Alo ($\bar{X} = 10,12 \pm 1,26$) e Alo ($\bar{X} = 9,978 \pm 1,49$) apresentaram significativa redução das médias de IMF de CD11b quando comparadas com as observadas em T140 ($\bar{X} = 24,88 \pm 3,28$, $p < 0,0001$; $\bar{X} = 24,93 \pm 3,67$, $p < 0,0001$; $\bar{X} = 18,43 \pm 3,10$, $p < 0,001$; $\bar{X} = 16,08 \pm 3,17$, $p < 0,01$, *respectivamente*).

Quando comparamos o primeiro (T0) e o último momento (T200) de avaliação não foi observada diferença estatística dentro dos grupos experimentais (Gráfico 8).

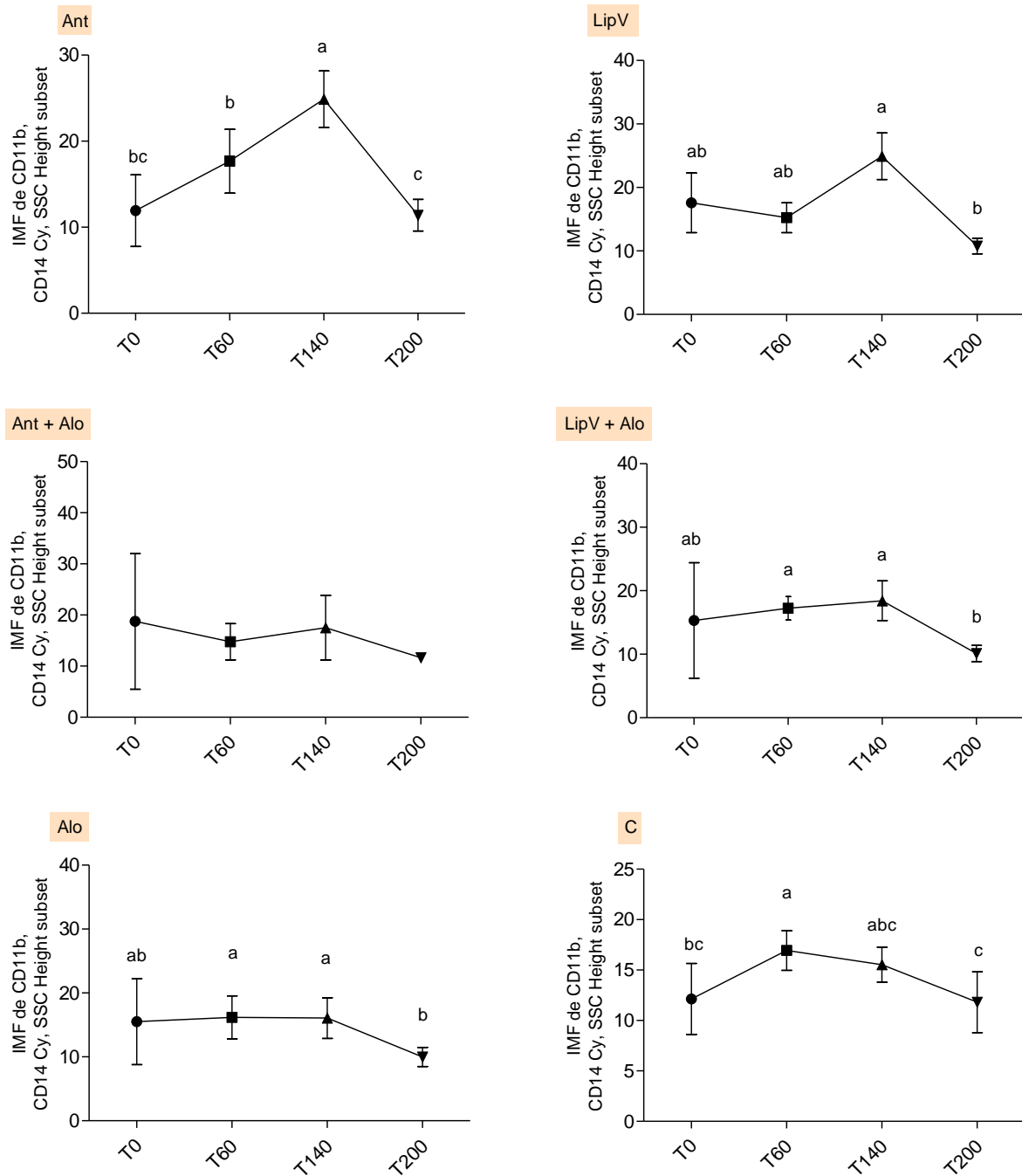


Gráfico 8: Cinética de alterações fenotípicas de monócitos CD14⁺ em relação à intensidade média de fluorescência (IMF) de CD11b/CD18 considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a, b e c), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

Ant [T0 \bar{X} = 11,93 ± 4,16; T60 \bar{X} = 17,68 ± 3,70; T140 \bar{X} = 24,88 ± 3,28; T200 \bar{X} = 11,40 ± 1,82];
 LipV [T0 \bar{X} = 17,58 ± 11,51; T60 \bar{X} = 15,24 ± 2,34; T140 \bar{X} = 24,93 ± 3,67; T200 \bar{X} = 10,78 ± 1,21];
 Ant + Alo [T0 \bar{X} = 18,75 ± 13,27; T60 \bar{X} = 14,77 ± 3,52; T140 \bar{X} = 17,52 ± 6,3; T200 \bar{X} = 11,63 ± 2,17];
 LipV + Alo [T0 \bar{X} = 15,32 ± 9,10; T60 \bar{X} = 17,24 ± 1,85; T140 \bar{X} = 18,43 ± 3,10; T200 \bar{X} = 10,12 ± 1,26];
 Alo [T0 \bar{X} = 15,51 ± 6,7; T60 \bar{X} = 16,18 ± 3,37; T140 \bar{X} = 16,08 ± 3,17; T200 \bar{X} = 9,97 ± 1,49];
 C [T0 \bar{X} = 12,14 ± 3,52; T60 \bar{X} = 16,94 ± 1,97; T140 \bar{X} = 15,53 ± 1,73; T200 \bar{X} = 11,82 ± 3,01].

Avaliação da IMF de TLR-2 na população de monócitos CD14+

Quando consideramos a IMF de TLR-2, verificou-se que os grupos Ant ($\bar{X} = 27,30 \pm 6,5$) e LipV + Alo ($\bar{X} = 28,18 \pm 4,65$), no T140, apresentaram aumento significativo da expressão de TLR-2 quando comparada às médias observadas em T0 ($\bar{X} = 16,09 \pm 4,56; p < 0,01$ e $\bar{X} = 17,40 \pm 6,61; p < 0,0001$, *respectivamente*). O grupo Ant + Alo apresentou decréscimo inicial da média de IMF em T60 ($\bar{X} = 12,89 \pm 1,68$), quando comparada à média em T0 ($\bar{X} = 28,02 \pm 16,11, p < 0,01$), com posterior restabelecimento em T140, sem diferença estatística entre os momento T0 e T140.

Em T200, os grupos Ant ($\bar{X} = 14,87 \pm 3,96$), LipV + Alo ($\bar{X} = 18,63 \pm 3,63$) e Alo ($\bar{X} = 15,27 \pm 2,76$) apresentaram redução significativa dos valores de IMF quando comparados àqueles observados em T140 ($\bar{X} = 27,30 \pm 6,5, p < 0,0001$; $\bar{X} = 28,18 \pm 4,65, p < 0,001$ e $\bar{X} = 21,55 \pm 4,98, p < 0,01$, *respectivamente*).

Quando comparamos o primeiro e último momento de avaliação (T0 e T200), foi observada diferença estatística somente para o grupo Ant + Alo ($T0 \bar{X} = 28,02 \pm 16,11$ e $T200 \bar{X} = 14,43 \pm 3,92$; $p < 0,01$) (Gráfico 9).

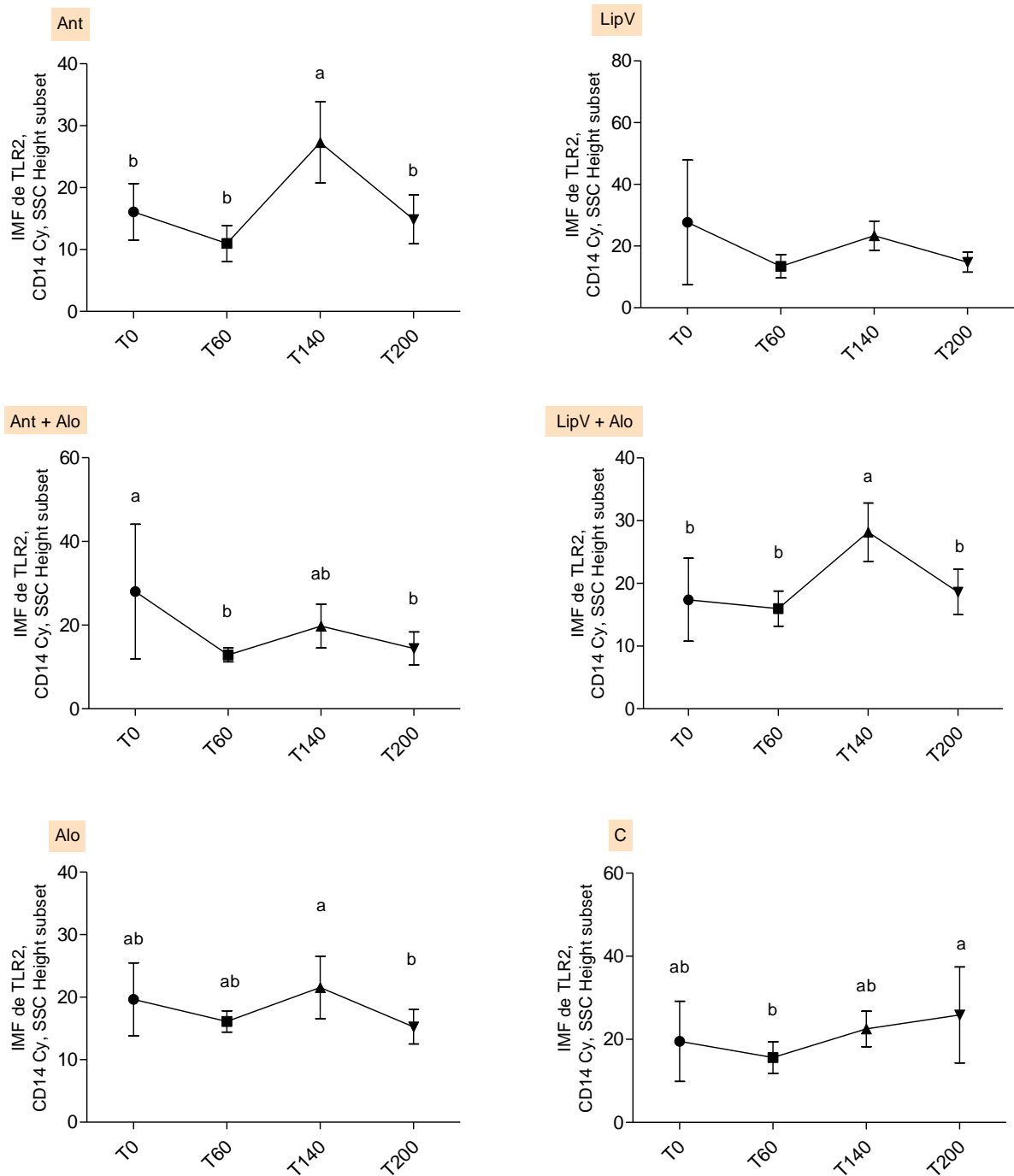


Gráfico 9: Cinética de alterações fenotípicas de monócitos CD14⁺ em relação à intensidade média de fluorescência (IMF) de TLR-2 considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste T de kruskal wallis.

Ant [T0 \bar{X} = 16,09 ± 4,56; T60 \bar{X} = 10,97 ± 2,91; T140 \bar{X} = 27,30 ± 6,5; T200 \bar{X} = 14,87 ± 3,96];
 LipV [T0 \bar{X} = 27,70 ± 20,20; T60 \bar{X} = 13,46 ± 3,77; T140 \bar{X} = 23,40 ± 4,73; T200 \bar{X} = 14,79 ± 3,21];
 Ant + Alo [T0 \bar{X} = 28,02 ± 16,11; T60 \bar{X} = 12,89 ± 1,68; T140 \bar{X} = 19,77 ± 5,26; T200 \bar{X} = 14,43 ± 3,92];
 LipV + Alo [T0 \bar{X} = 17,40 ± 6,61; T60 \bar{X} = 15,98 ± 2,80; T140 \bar{X} = 28,18 ± 4,65; T200 \bar{X} = 18,63 ± 3,63];
 Alo [T0 \bar{X} = 19,65 ± 5,8; T60 \bar{X} = 16,12 ± 1,69; T140 \bar{X} = 21,55 ± 4,98; T200 \bar{X} = 15,27 ± 2,76];
 C [T0 \bar{X} = 19,54 ± 9,64; T60 \bar{X} = 15,61 ± 3,79; T140 \bar{X} = 22,51 ± 4,27; T200 \bar{X} = 25,90 ± 11,55].

Avaliação da IMF de MHC classe II na população de monócitos CD14+

Quando consideramos a avaliação da IMF do complexo de histocompatibilidade principal do tipo II (MHCII), o grupo Ant não apresentou diferença estatística entre os tempos T0 a T140. Contrariamente, no tempo T60, observou-se redução significativa dos valores de IMF de MHCII para os grupos Ant + Alo ($\bar{X} = 10,57 \pm 2,5$), LipV + Alo ($\bar{X} = 14,78 \pm 4,83$), Alo ($\bar{X} = 17,58 \pm 4,25$) e C ($\bar{X} = 17,27 \pm 4,55$), quando comparados àqueles verificados em T0 ($\bar{X} = 53,48 \pm 50,25, p < 0,01$; $\bar{X} = 41,87 \pm 25,04, p < 0,01$; $\bar{X} = 71,11 \pm 52,0, p < 0,0001$ e $\bar{X} = 56,45 \pm 44,70, p < 0,01, respectivamente$). Entretanto, para esses grupos, as médias observadas no período T140 não se diferenciaram daquelas observadas em T0.

Somente o grupo tratado com Ant apresentou diferença estatística entre os momentos T140 ($X = 24,10 \pm 8,60$) e T200 ($X = 11,88 \pm 5,02$) com $p < 0,01$.

A cinética entre os tempos T0 e T200 apresentou-se semelhante, com redução significativa das médias de IMF no último tempo avaliado, para os grupos Ant ($T0 \bar{X} = 26,37 \pm 17,01$; $T200 \bar{X} = 11,88 \pm 5,02$; $p < 0,01$), Ant + Alo ($T0 \bar{X} = 53,48 \pm 50,25$; $T200 \bar{X} = 10,73 \pm 3,17$; $p < 0,01$), LipV + Alo ($T0 \bar{X} = 41,87 \pm 25,04$; $T200 \bar{X} = 18,24 \pm 6,08$; $p < 0,001$), Alo ($T0 \bar{X} = 71,11 \pm 52,0$; $T200 \bar{X} = 18,24 \pm 7,52$; $p < 0,01$) e C ($T0 \bar{X} = 56,45 \pm 44,70$; $T200 \bar{X} = 20,11 \pm 3,26$; $p < 0,01$) (Gráfico 10).

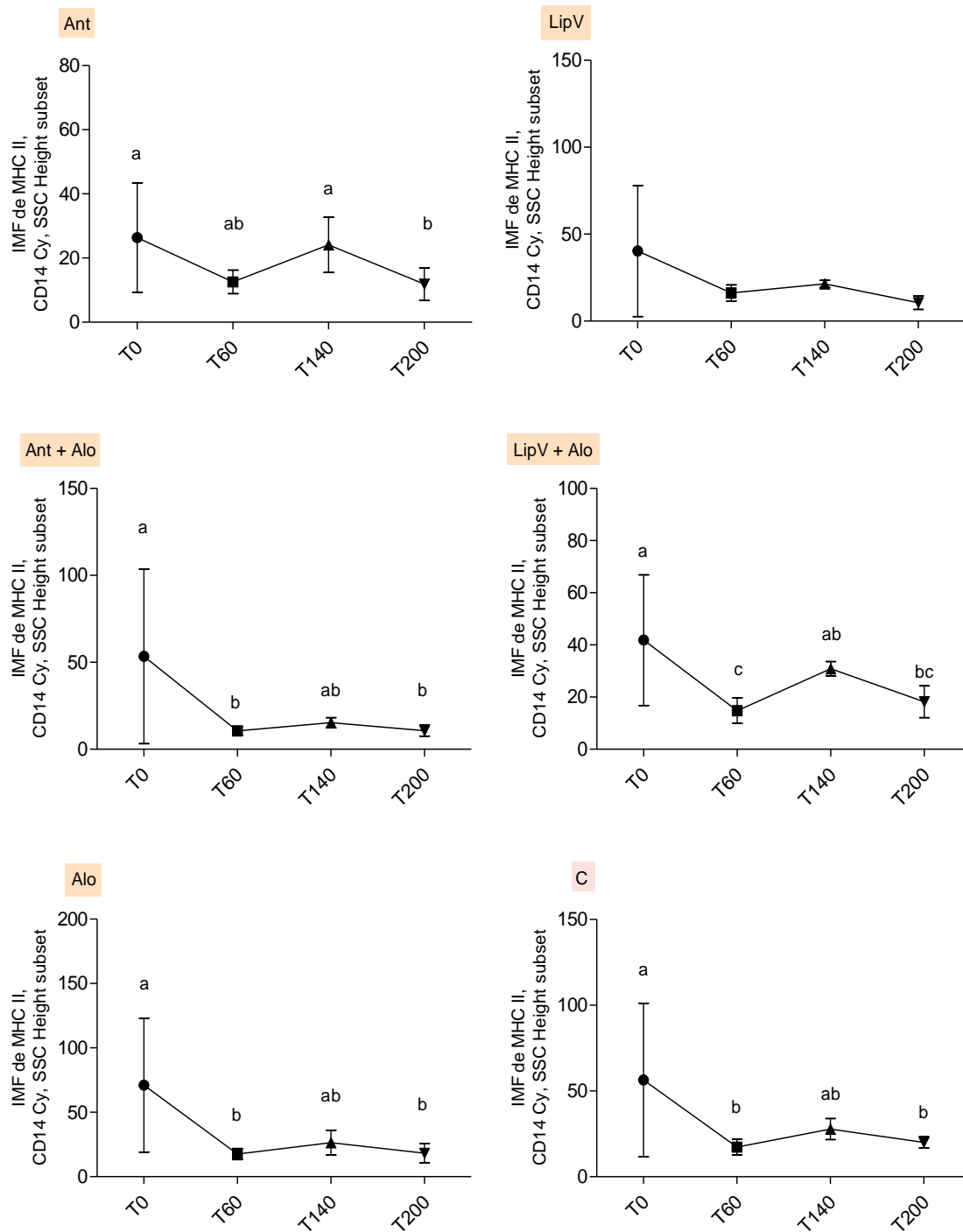


Gráfico 10: Cinética de alterações fenotípicas de monócitos CD14⁺ em relação à intensidade média de fluorescência (IMF) de MHC classe II considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a, b e c), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

Ant [T0 \bar{X} = 26,37 ± 17,01; T60 \bar{X} = 12,58 ± 3,66; T140 \bar{X} = 24,10 ± 8,60; T200 \bar{X} = 11,88 ± 5,02];
 LipV [T0 \bar{X} = 40,25 ± 37,69; T60 \bar{X} = 16,19 ± 4,59; T140 \bar{X} = 21,38 ± 2,06; T200 \bar{X} = 10,61 ± 3,91];
 Ant + Alo [T0 \bar{X} = 53,48 ± 50,25; T60 \bar{X} = 10,57 ± 2,50; T140 \bar{X} = 15,28 ± 2,92; T200 \bar{X} = 10,73 ± 3,17];
 LipV + Alo [T0 \bar{X} = 41,87 ± 25,04; T60 \bar{X} = 14,78 ± 4,83; T140 \bar{X} = 30,89 ± 7,79; T200 \bar{X} = 18,24 ± 6,08];
 Alo [T0 \bar{X} = 71,11 ± 52,0; T60 \bar{X} = 17,58 ± 4,25; T140 \bar{X} = 26,44 ± 9,71; T200 \bar{X} = 18,24 ± 7,52];
 C [T0 \bar{X} = 56,45 ± 44,70; T60 \bar{X} = 17,27 ± 4,55; T140 \bar{X} = 27,27 ± 6,13; T200 \bar{X} = 20,11 ± 3,26].

Avaliação da frequência de linfócitos T CD4

A frequência da população de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺, ao longo do experimento, considerando o mesmo grupo de tratamento, somente apresentou diferença no grupo Alo. Nesse, a média observada em T60 ($\bar{X} = 0,267 \pm 0,060$) foi significativamente inferior aquela observada em T200 ($\bar{X} = 0,342 \pm 0,038$; $p < 0,01$). Sendo que, para os demais momentos avaliados não houve diferença estatística (Gráfico 11).

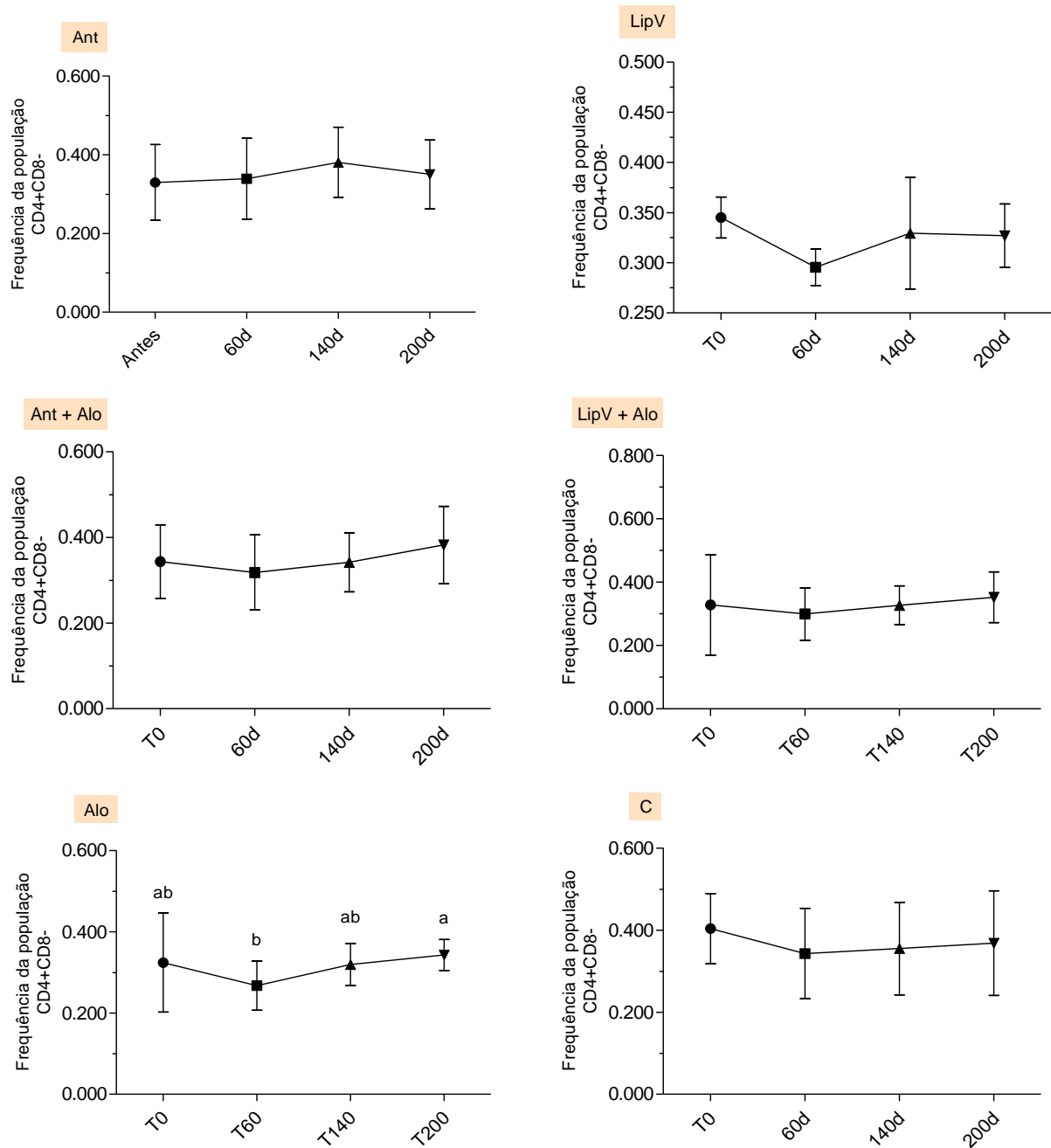


Gráfico 11: Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ em células mononucleares do sangue periférico de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

Ant [T0 $\bar{X} = 0,329 \pm 0,096$; T60 $\bar{X} = 0,339 \pm 0,102$; T140 $\bar{X} = 0,386 \pm 0,089$; T200 $\bar{X} = 0,350 \pm 0,087$];

LipV [T0 $\bar{X} = 0,345 \pm 0,020$; T60 $\bar{X} = 0,295 \pm 0,018$; T140 $\bar{X} = 0,329 \pm 0,055$; T200 $\bar{X} = 0,327 \pm 0,031$];

Ant + Alo [T0 $\bar{X} = 0,343 \pm 0,086$; T60 $\bar{X} = 0,318 \pm 0,087$; T140 $\bar{X} = 0,341 \pm 0,069$; T200 $\bar{X} = 0,382 \pm 0,090$];

LipV + Alo [T0 $\bar{X} = 0,328 \pm 0,158$; T60 $\bar{X} = 0,299 \pm 0,082$; T140 $\bar{X} = 0,327 \pm 0,061$; T200 $\bar{X} = 0,352 \pm 0,080$];

Alo [T0 $\bar{X} = 0,323 \pm 0,121$; T60 $\bar{X} = 0,267 \pm 0,060$; T140 $\bar{X} = 0,319 \pm 0,051$; T200 $\bar{X} = 0,342 \pm 0,038$];

C [T0 $\bar{X} = 0,403 \pm 0,085$; T60 $\bar{X} = 0,342 \pm 0,110$; T140 $\bar{X} = 0,355 \pm 0,112$; T200 $\bar{X} = 0,368 \pm 0,127$].

Quando consideramos a avaliação da frequência da população de linfócitos T CD4⁺/CD8⁻, entre os grupos experimentais, considerando o mesmo período de avaliação (T0, T60, T140 e T200), não foi observada qualquer diferença estatística entre os grupos (Gráfico 12).

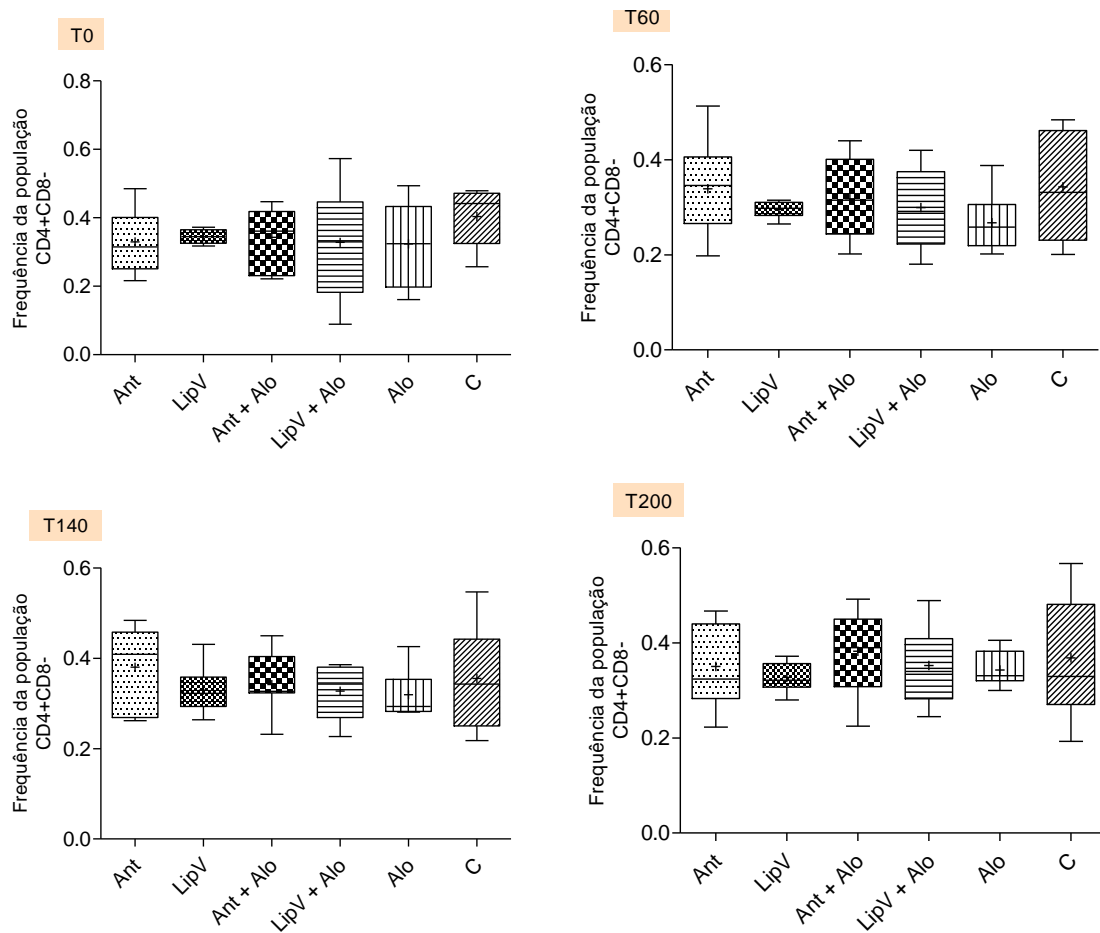


Gráfico 12: Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ em células mononucleares do sangue periférico, considerando o mesmo período de avaliação (T0, T60, T140, T201), entre os cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico. Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

T0[Ant \bar{X} = 0,329 ± 0,096; LipV \bar{X} = 0,345 ± 0,020; Ant + Alo \bar{X} = 0,343 ± 0,08; LipV + Alo \bar{X} = 0,328 ± 0,158; Alo \bar{X} = 0,324 ± 0,122; C \bar{X} = 0,403 ± 0,086]. T60[Ant \bar{X} = 0,339 ± 0,102; LipV \bar{X} = 0,295 ± 0,018; Ant + Alo \bar{X} = 0,318 ± 0,087; LipV + Alo \bar{X} = 0,299 ± 0,082; Alo \bar{X} = 0,267 ± 0,060; C \bar{X} = 0,343 ± 0,110]. T140[Ant \bar{X} = 0,380 ± 0,089; LipV \bar{X} = 0,329 ± 0,055; Ant + Alo \bar{X} = 0,342 ± 0,069; LipV + Alo \bar{X} = 0,327 ± 0,06; Alo \bar{X} = 0,319 ± 0,05; C \bar{X} = 0,355 ± 0,13]. T200[Ant \bar{X} = 0,350 ± 0,087; LipV \bar{X} = 0,327 ± 0,031; Ant + Alo \bar{X} = 0,382 ± 0,09; LipV + Alo \bar{X} = 0,3521 ± 0,08; Alo \bar{X} = 0,342 ± 0,038; C \bar{X} = 0,368 ± 0,127].

Avaliação da IMF de CD4 na população de linfócitos T CD4 de um mesmo grupo experimental

A avaliação da IMF de CD4 na população de linfócitos T CD4, ao longo dos períodos de avaliação, considerando o mesmo grupo experimental, demonstrou que no tempo T140 os grupos Ant ($\bar{X} = 301,2 \pm 51,80$), LipV ($\bar{X} = 241,3 \pm 95,81$), Alo ($\bar{X} = 247,8 \pm 45,41$) e C ($\bar{X} = 235,0 \pm 53,73$) apresentaram médias de IMF estatisticamente superiores quando comparadas àquelas observadas antes do início do tratamento (T0) ($\bar{X} = 154,5 \pm 50,43, p < 0,0001$; $\bar{X} = 119,3 \pm 93,09, p < 0,01$; $\bar{X} = 119,7 \pm 89,98, p < 0,001$; $\bar{X} = 128,6 \pm 86,75, p < 0,001, respectivamente$).

Considerando a avaliação desse mesmo período (T0 a T140), o grupo tratado com LipV + Alo apresentou diminuição significativa da média de IMF em T60 ($\bar{X} = 103,1 \pm 43,97$) quando comparada à observada em T0 ($\bar{X} = 175,4 \pm 64,63; p < 0,01$). Entretanto, o valor obtido em T140 ($\bar{X} = 227,6 \pm 51,42$) apresentou-se estatisticamente superior ao obtido em T60 ($\bar{X} = 103,1 \pm 43,97; p < 0,0001$).

As médias obtidas em T200 foram significativamente inferiores àquelas observadas em T140 para os grupos Ant ($T140 \bar{X} = 301,2 \pm 51,80$; $T200 \bar{X} = 102,2 \pm 19,94; p < 0,0001$), LipV ($T140 \bar{X} = 241,3 \pm 95,81$; $T200 \bar{X} = 104,7 \pm 26,74; p < 0,001$), LipV + Alo ($T140 \bar{X} = 227,6 \pm 51,42$; $T200 \bar{X} = 146,5 \pm 20,58; p < 0,01$), Alo ($T140 \bar{X} = 247,8 \pm 45,41$; $T200 \bar{X} = 164,8 \pm 23,38; p < 0,01$) e C ($T140 \bar{X} = 235,0 \pm 53,73$; $T200 \bar{X} = 165,3 \pm 21,41; P < 0,01$). (Gráfico 13)

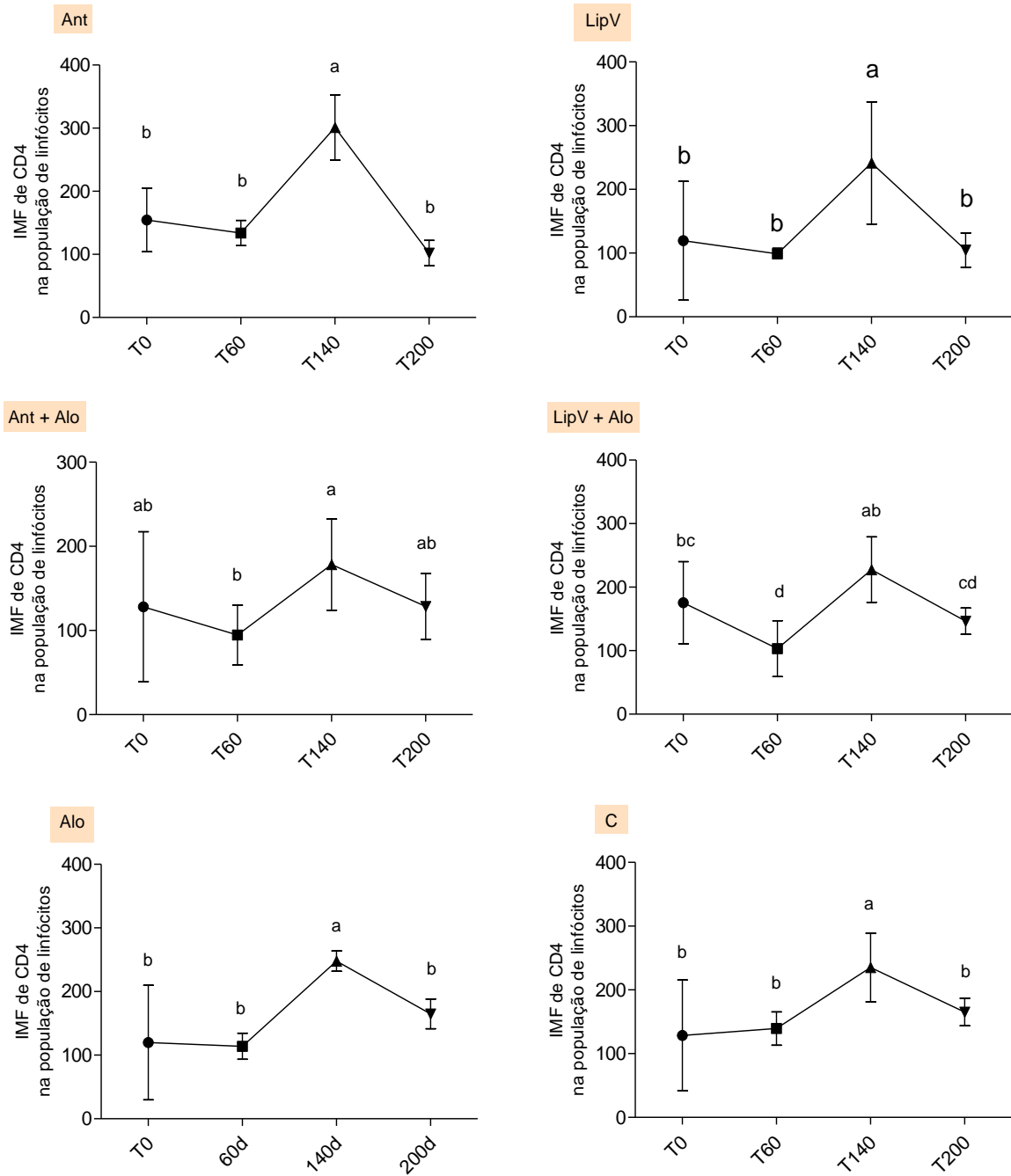


Gráfico 13: Cinética de alterações fenotípicas de linfócitos T em relação à intensidade média de fluorescência (IMF) de CD4 considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a, b e c), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.
 Ant [T0 \bar{X} = 154,5 ± 50,43; T60 \bar{X} = 133,7 ± 20,01; T140 \bar{X} = 301,2 ± 51,80; T200 \bar{X} = 102,2 ± 19,94];
 LipV [T0 \bar{X} = 119,3 ± 93,09; T60 \bar{X} = 98,76 ± 8,68; T140 \bar{X} = 241,3 ± 95,81; T200 \bar{X} = 104,7 ± 26,74];
 Ant + Alo [T0 \bar{X} = 128,2 ± 89,13; T60 \bar{X} = 94,68 ± 35,55; T140 \bar{X} = 178,3 ± 54,07; T200 \bar{X} = 128,7 ± 39,27];
 LipV + Alo [T0 \bar{X} = 175,4 ± 64,63; T60 \bar{X} = 103,1 ± 43,97; T140 \bar{X} = 227,6 ± 51,42; T200 \bar{X} = 146,5 ± 20,58];
 Alo [T0 \bar{X} = 119,7 ± 89,98; T60 \bar{X} = 114,0 ± 20,58; T140 \bar{X} = 247,8 ± 45,41; T200 \bar{X} = 164,8 ± 23,38];
 C [T0 \bar{X} = 128,6 ± 86,75; T60 \bar{X} = 139,4 ± 26,13; T140 \bar{X} = 235,0 ± 53,73; T200 \bar{X} = 165,3 ± 21,41].

Avaliação da frequência de linfócitos T CD8

A frequência da população de linfócitos T CD4⁻/CD8⁺, considerando o mesmo grupo de tratamento, não apresentou diferença estatística ao longo do experimento (Gráfico 14).

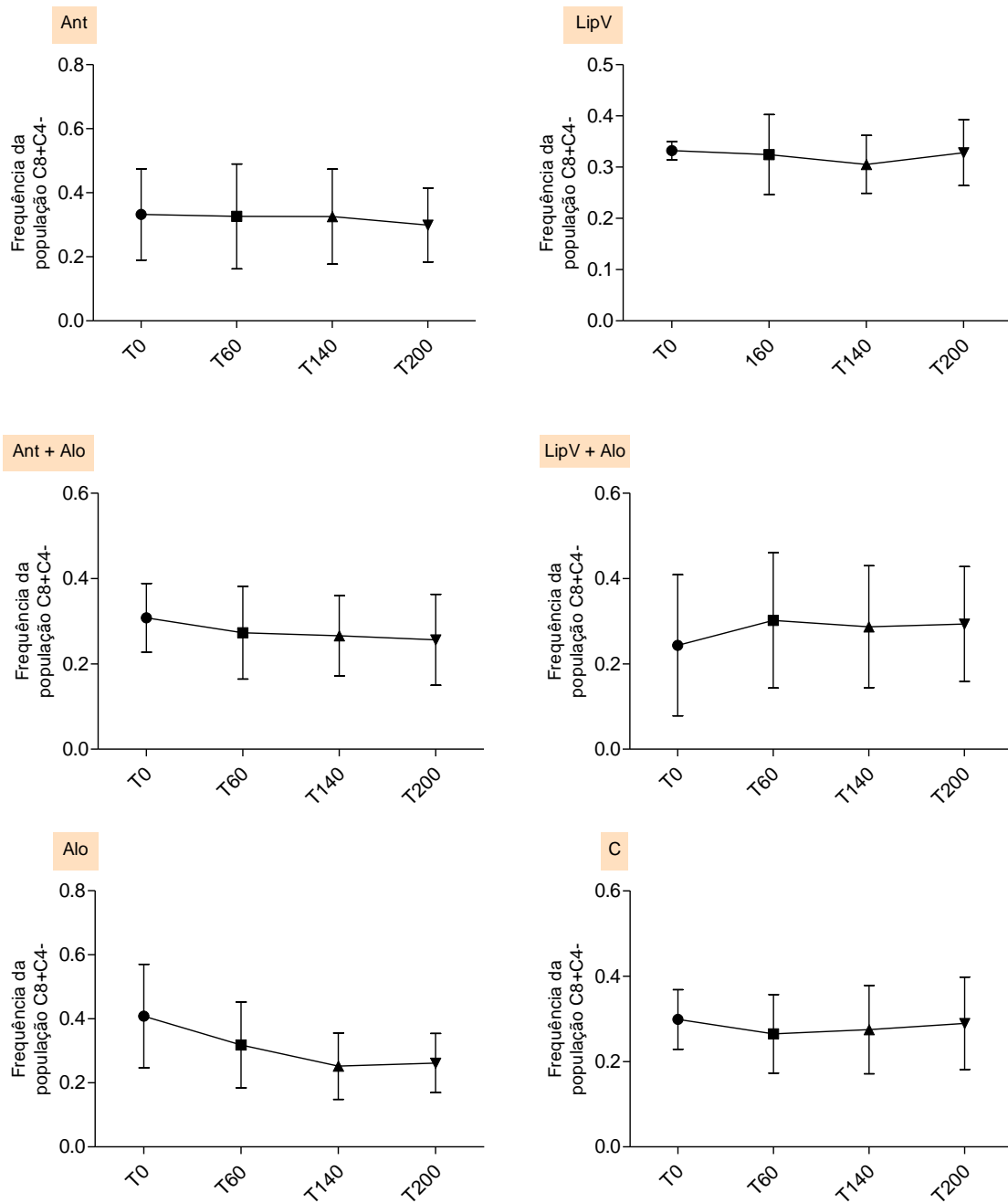


Gráfico 14: Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ em células mononucleares do sangue periférico de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

Ant [T0 \bar{X} = 0,332 ± 0,142; T60 \bar{X} = 0,326 ± 0,163; T140 \bar{X} = 0,325 ± 0,148; T200 \bar{X} = 0,299 ± 0,115];
 LipV [T0 \bar{X} = 0,332 ± 0,017; T60 \bar{X} = 0,324 ± 0,078; T140 \bar{X} = 0,305 ± 0,056; T200 \bar{X} = 0,328 ± 0,064];
 Ant + Alo [T0 \bar{X} = 0,307 ± 0,080; T60 \bar{X} = 0,272 ± 0,108; T140 \bar{X} = 0,265 ± 0,094; T200 \bar{X} = 0,256 ± 0,1065];
 LipV + Alo [T0 \bar{X} = 0,243 ± 0,165; T60 \bar{X} = 0,3018 ± 0,1585; T140 \bar{X} = 0,287 ± 0,142; T200 \bar{X} = 0,293 ± 0,134];
 Alo [T0 \bar{X} = 0,408 ± 0,161; T60 \bar{X} = 0,318 ± 0,134; T140 \bar{X} = 0,252 ± 0,103; T200 \bar{X} = 0,261 ± 0,0925];
 C [T0 \bar{X} = 0,298 ± 0,069; T60 \bar{X} = 0,264 ± 0,091; T140 \bar{X} = 0,274 ± 0,103; T200 \bar{X} = 0,289 ± 0,108].

Quando consideramos a avaliação da frequência da população de linfócitos T CD8⁺/CD4⁻, entre os grupos experimentais, considerando o mesmo período de avaliação (T0, T60, T140 e T200), não foi observada também qualquer diferença estatística entre os grupos (Gráfico 15).

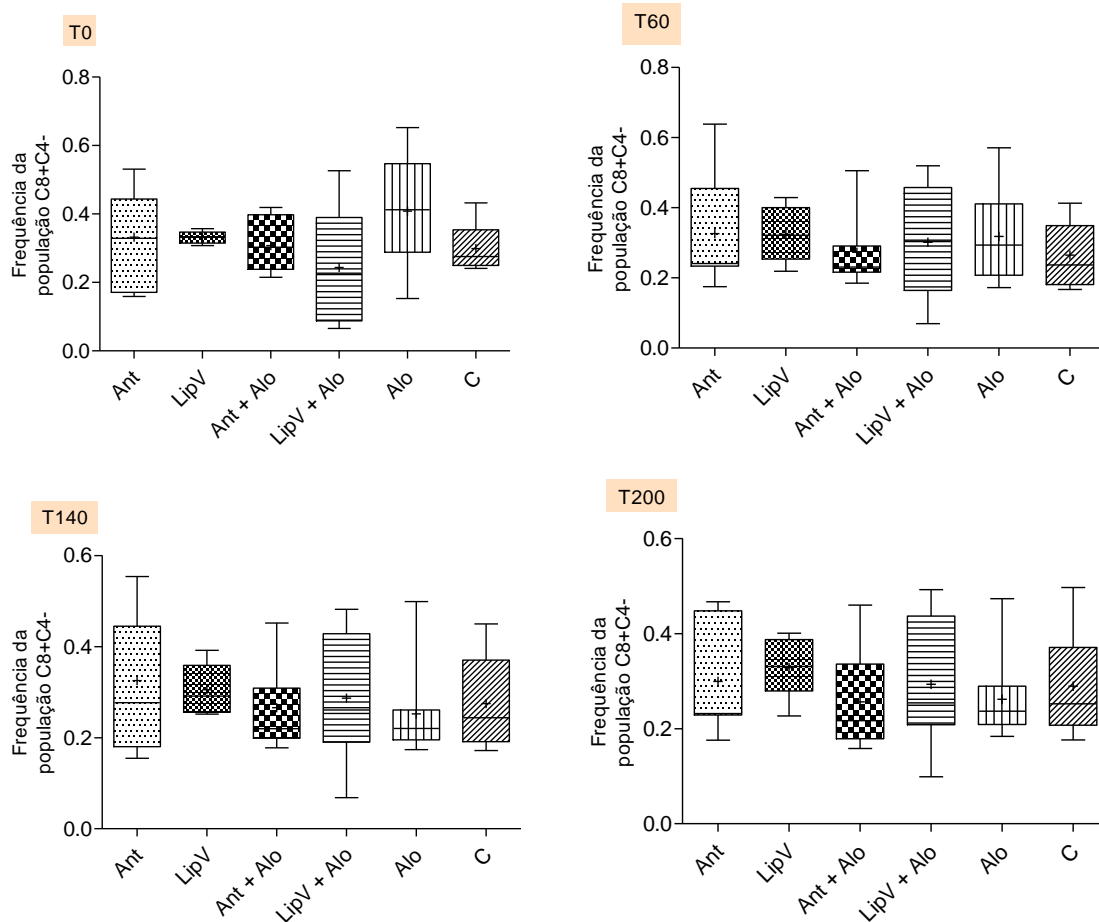


Gráfico 15: Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ em células mononucleares do sangue periférico, considerando o mesmo período de avaliação (T0, T60, T140, T201), entre os cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico. Ant: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos não apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

Avaliação da IMF de CD8 na população de linfócitos T CD8 de um mesmo grupo experimental

A avaliação da IMF de CD8 na população de linfócitos T, ao longo dos períodos de avaliação, considerando o mesmo grupo experimental, demonstrou que no tempo T60 os grupos LipV + Alo ($\bar{X} = 65,16 \pm 24,47$) e Alo ($\bar{X} = 79,10 \pm 16,90$) apresentaram médias de IMF estatisticamente inferiores quando comparadas àquelas observadas antes do início do tratamento (T0) ($\bar{X} = 112,8 \pm 36,10, p < 0,01$ e $\bar{X} = 106,3 \pm 14,23, p < 0,01$; *respectivamente*).

As médias obtidas em T200 foram significativamente inferiores àquelas observadas em T140 somente para o grupo Ant ($T140 \bar{X} = 135,0 \pm 31,20$; $T200 \bar{X} = 72,32 \pm 13,60$; $p < 0,001$) (Gráfico 16).

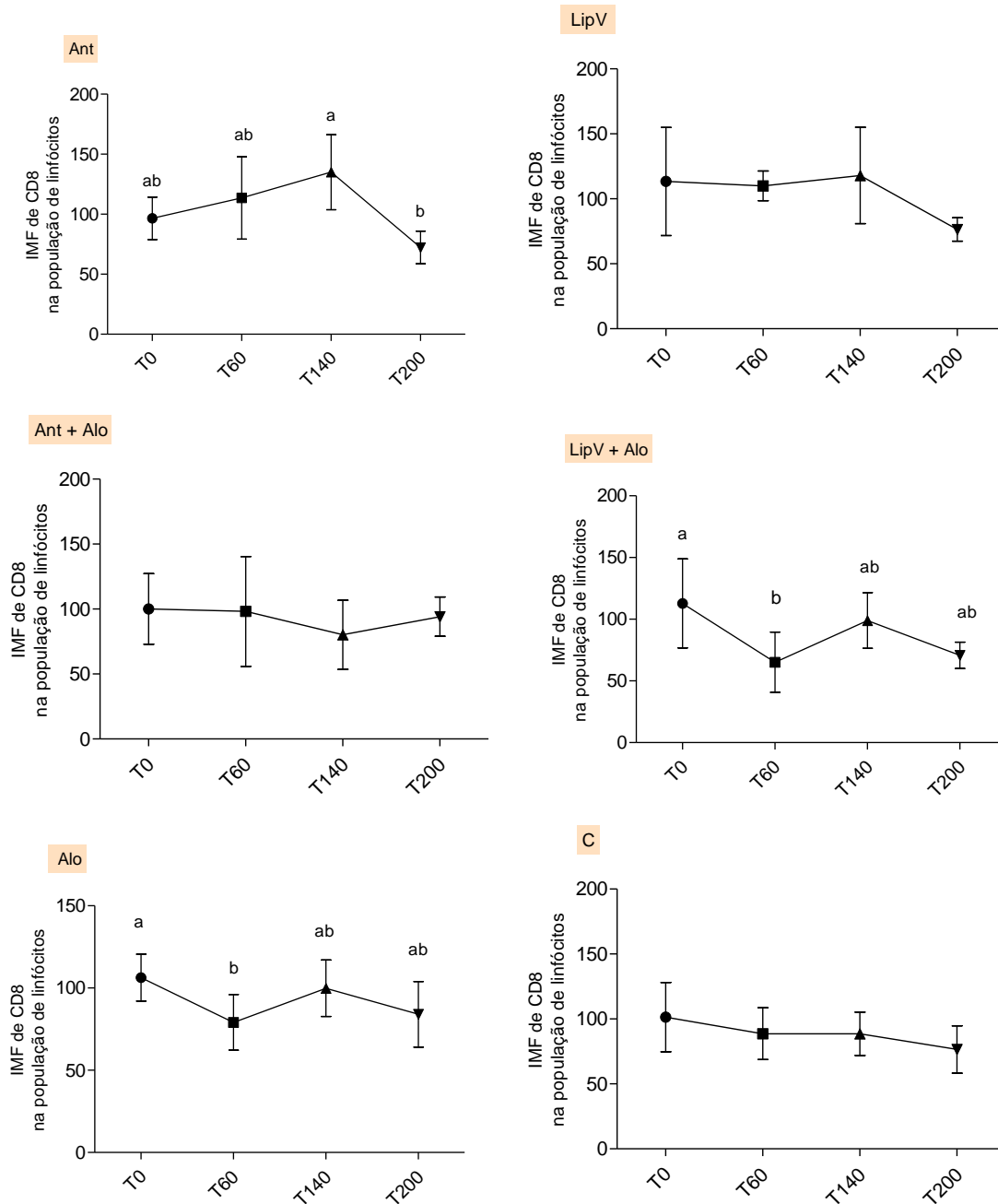


Gráfico 16: Cinética de alterações fenotípicas de linfócitos T em relação à intensidade média de fluorescência (IMF) de CD8 considerando o mesmo grupo experimental de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T200). Ant: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (n=7); LipV: lipossomas nanométricos vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b) diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

Ant [T0 \bar{X} = 96,54 ± 17,69; T60 \bar{X} = 113,6 ± 34,37; T140 \bar{X} = 135,0 ± 31,20; T200 \bar{X} = 72,32 ± 13,60];
 LipV [T0 \bar{X} = 113,4 ± 41,58; T60 \bar{X} = 110,0 ± 11,43; T140 \bar{X} = 118,0 ± 37,09; T200 \bar{X} = 76,47 ± 9,07];
 Ant + Alo [T0 \bar{X} = 100,1 ± 27,20; T60 \bar{X} = 98,17 ± 42,26; T140 \bar{X} = 80,17 ± 26,63; T200 \bar{X} = 94,10 ± 15,07];
 LipV + Alo [T0 \bar{X} = 112,8 ± 36,10; T60 \bar{X} = 65,16 ± 24,47; T140 \bar{X} = 98,95 ± 22,58; T200 \bar{X} = 70,76 ± 10,59];
 Alo [T0 \bar{X} = 106,3 ± 14,23; T60 \bar{X} = 79,10 ± 16,90; T140 \bar{X} = 99,84 ± 17,19; T200 \bar{X} = 84,00 ± 19,94];
 C [T0 \bar{X} = 101,4 ± 26,71; T60 \bar{X} = 88,65 ± 19,98; T140 \bar{X} = 88,55 ± 16,64; T200 \bar{X} = 76,51 ± 18,19].

7.5 – Análises Histopatológicas

TEGUMENTO

7.5.1. Alterações anatomopatológicas da pele da face interna da pua direita antes do início do tratamento

O exame dermatológico foi realizado em todos os cães antes do início da administração do protocolo terapêutico (T0), sendo que, os aspectos abordados foram: dermatite esfoliativa, hiperqueratose, alopecia, hipotricose, seborreia seca e úmida, úlcera, vasculite de ponta de cauda e orelha, hiperpigmentação e onicogribose.

Antes do início do tratamento, sinais como dermatite esfoliativa, hiperqueratose, seborreia seca e úmida, úlcera e onicogribose foram observados em pelo menos um animal, que seria posteriormente direcionado a seu grupo experimental. Destaca-se nesse contexto, o quadro referente à seborreia seca, que se manifestou em pelo menos 50% dos cães que formariam cada grupo experimental (Gráfico 17).

Antes do início do tratamento (T0)

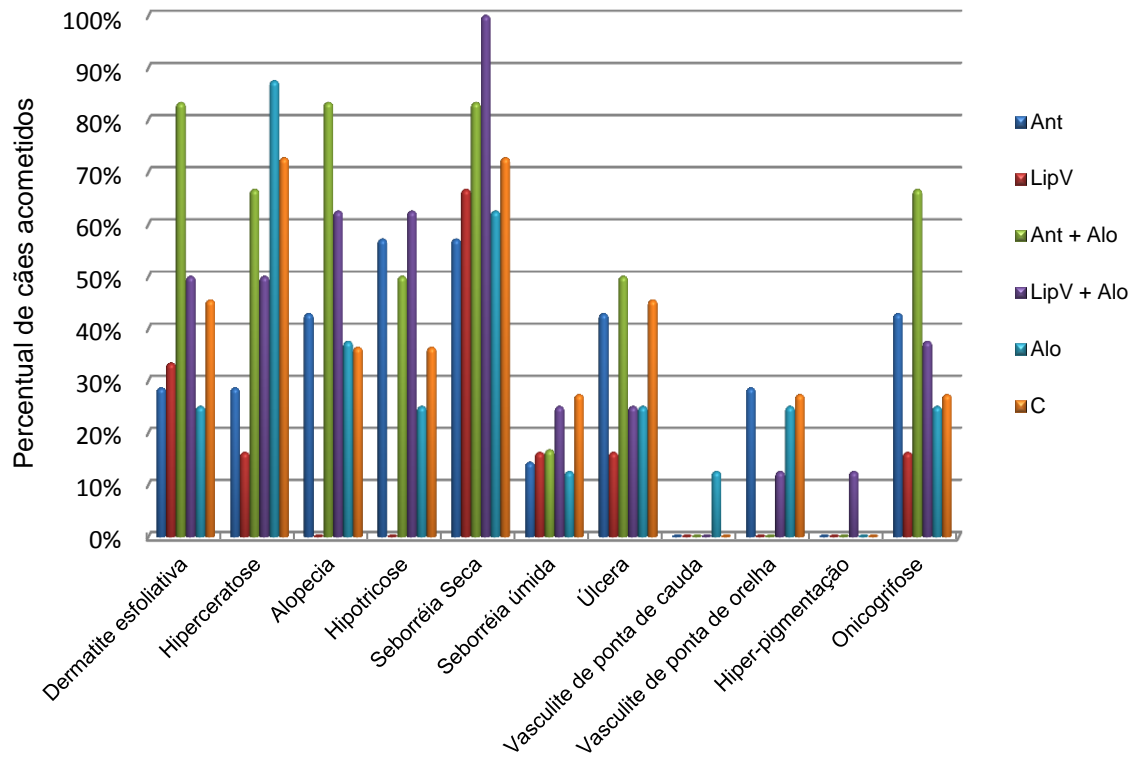


Gráfico 17 Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães antes do início do protocolo terapêutico (T0).

7.5.2. Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de tamanho nanométricos associados ao alopurinol, antes do tratamento e nos momentos da avaliação clínica

No grupo de cães tratados com Ant (n=7), antes do início do tratamento (T0), nove das onze alterações dermatológicas investigadas encontravam-se presentes em pelo menos 28,6% dos cães (n=2). Ao longo das avaliações sequenciais observou-se que sinais como a hipotricose e dermatite esfoliativa não foram mais evidenciadas após 50 (T50) e 140 dias (T140) de tratamento, respectivamente. Assim, quando comparamos o último (T201) com o primeiro momento de avaliação (T0), cinco sinais clínicos dermatológicos ainda permaneciam presentes, tais como: hiperkeratose, alopecia, úlcera e vasculite de ponta de orelha e onicogribose. Desses sinais, três não apresentaram diferença quando comparamos a T0, apesar de apresentarem modificações em sua frequência ao longo do experimento (Gráfico 18).

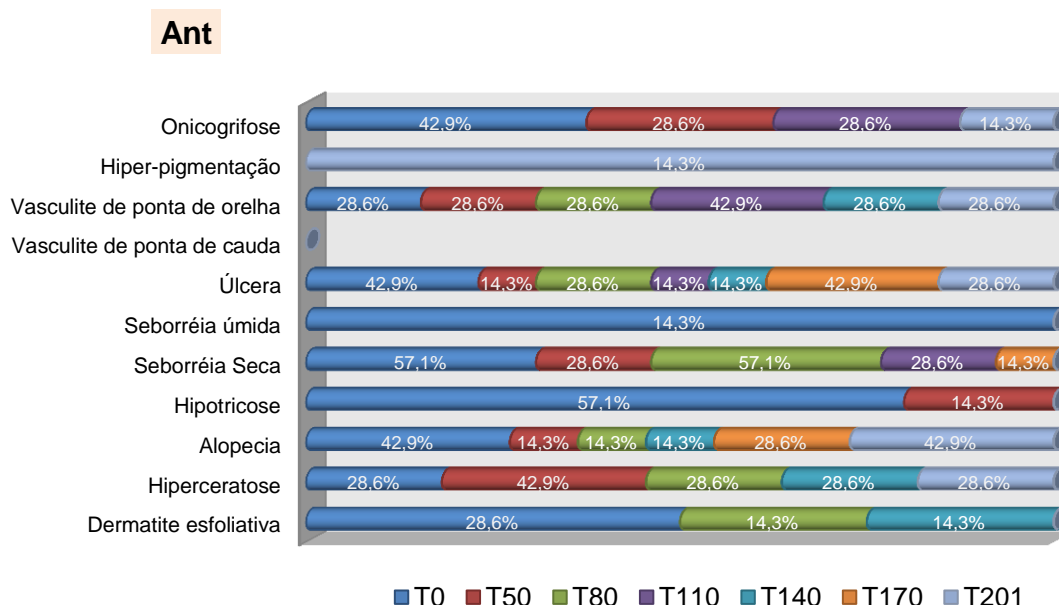


Gráfico 18: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

No grupo de cães tratados com LipV (n=6), antes do início do tratamento (T0), seis das onze alterações dermatológicas investigadas encontravam-se presentes em pelo menos um dos animais (16,6%). Ao longo das investigações posteriores, apenas duas dessas alterações dermatológicas, seborreia seca e onicogrifose, não foram mais observadas quando consideramos o último momento de avaliação. Desta forma, quatro dos sinais evidenciados em T0 ainda puderam ser identificados em T201, somados a esses, outras quatro alterações - alopecia, hipotricose, vasculite de ponta de orelha e vasculite de ponta de cauda – desenvolvidas ao longo do experimento foram observadas conjuntamente em T201 (Gráfico 19).

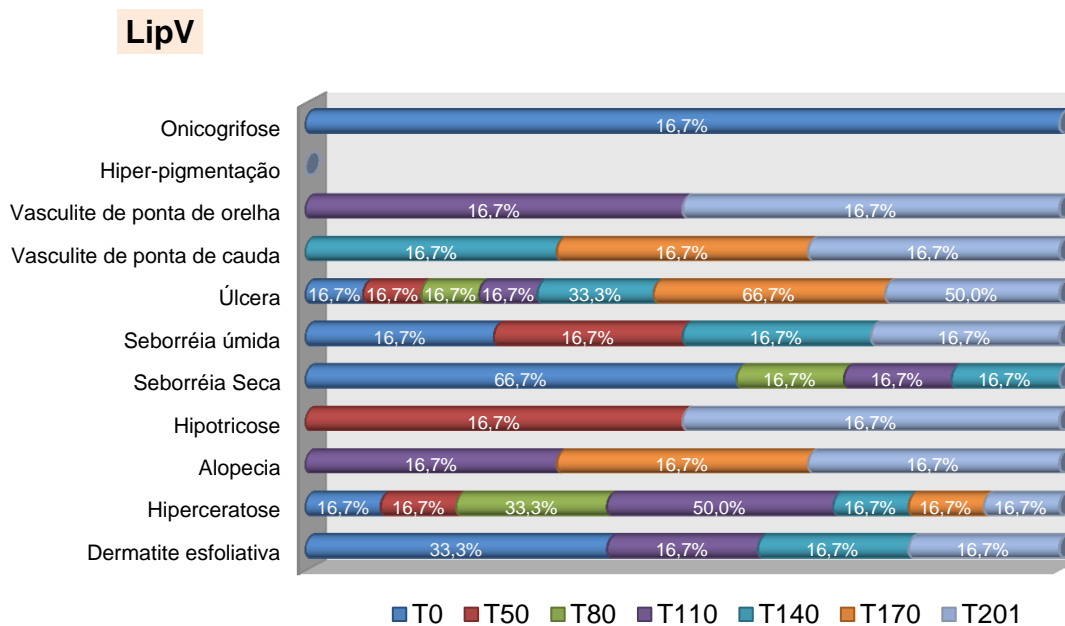


Gráfico 19: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com lipossomas nanométricos vazios antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

Quando consideramos o grupo tratado com a associação de Ant + Alo (n=6), em T0, oito dos onze sinais dermatológicos investigados encontravam-se presente entre os cães, sendo que, excetuando-se a seborreia úmida que acometeu um animal (16,7%), os outros sinais contemplavam, pelo menos, 50% dos cães (n=3). Desses sinais, três, tais como: dermatite esfoliativa, seborreia úmida e onicogrifose apresentaram completa remissão antes da primeira avaliação após o início do tratamento (T50). Ao passo que, o quadro de hipotricose, seborreia seca e úlcera somente puderam ser evidenciados até T50 e T170, respectivamente. Quando consideramos o último momento de avaliação (T201), dois dos sinais inicialmente presentes ainda foram observados (hiperceratose e alopecia), entretanto, em todos eles observou-se diminuição expressiva de sua frequência quando comparada aquela observada em T0, com apenas um cão acometido (16,7%) para cada alteração (Gráfico 20).

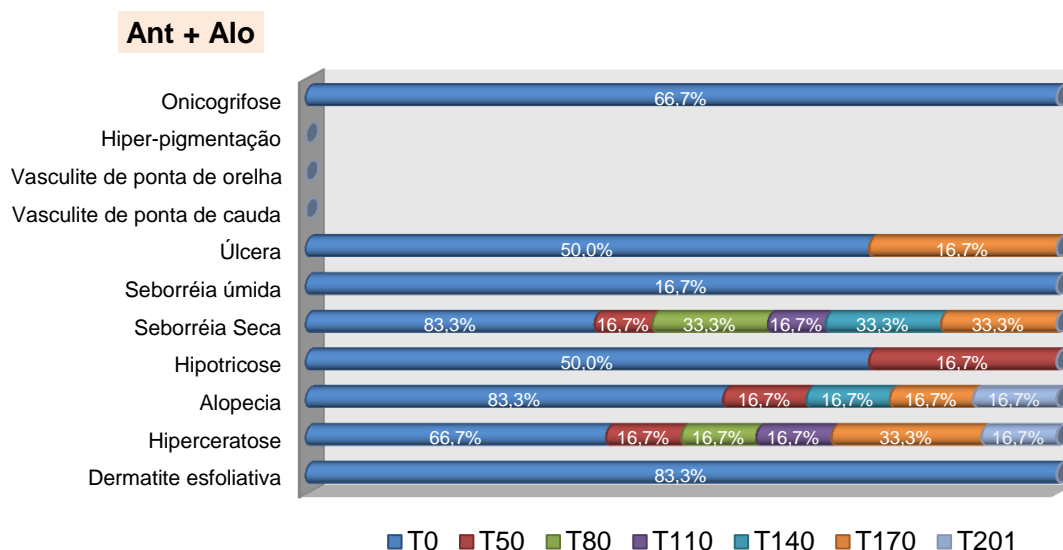


Gráfico 20: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

O grupo tratado com LipV + Alo (n=8) apresentou, antes do início do tratamento (T0), dez dos onze sinais dermatológicos avaliados. Desses, três como: hipotricose, vasculite de ponta de orelha e hiper-pigmentação somente foram identificados até T50. Quando analisamos T201, todos os cinco sinais ainda presentes - dermatite esfoliativa, hiperkeratose, seborreia seca, seborreia úmida e onicogribose - apresentaram redução expressiva de suas frequências quando comparadas aquelas observadas em T0. Destaca-se nesse contexto o quadro de seborreia seca, o qual estava presente em 100% dos cães antes do início do tratamento (T0) e apenas pode ser identificada em um cão (12,5%) no fim do experimento (T201) (Gráfico 21).

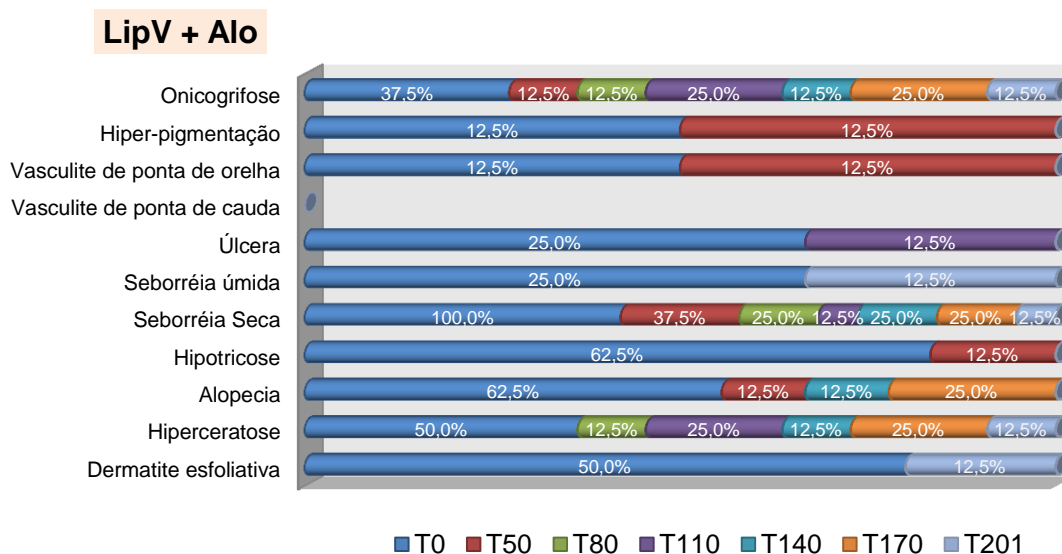


Gráfico 21: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com lipossomas nanométricos vazios associado ao alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

O grupo tratado somente com alopurinol (Alo) (n=8) apresentou melhora de sete dos dez sinais inicialmente observados em T0 até os 170 dias após o início do tratamento (T170). Dois (dermatite esfoliativa e seborreia úmida) e três (hiperceratose, vasculite de ponta de orelha e vasculite de ponta de cauda) sinais somente puderam ser evidenciados até T0 e T50, respectivamente. Dos três sinais ainda presentes em T201, dois apresentaram sua frequência diminuída quando comparada ao primeiro momento de avaliação (Gráfico 22).

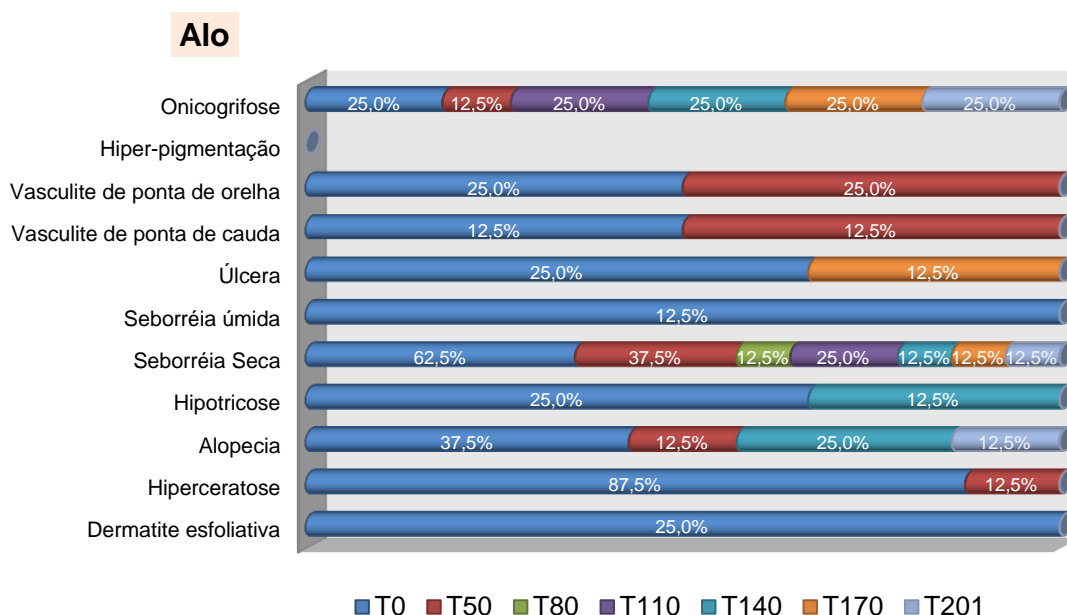


Gráfico 22: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães submetidos a protocolo terapêutico com alopurinol antes do tratamento (T0) e nos momento das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

Os cães do grupo controle (n=11) apresentaram no primeiro momento de avaliação (T0), nove dos onze sinais dermatológicos investigados e contrariamente aos grupos anteriores, nenhum desses apresentou completa remissão quando consideramos o último momento de avaliação (T201).

Entretanto, observou-se redução da frequência de: dermatite esfoliativa, hiperkeratose, alopecia, hipotricose, seborreia seca, seborreia úmida e úlcera quando comparada ao percentual presente em T0 (Gráfico 23).

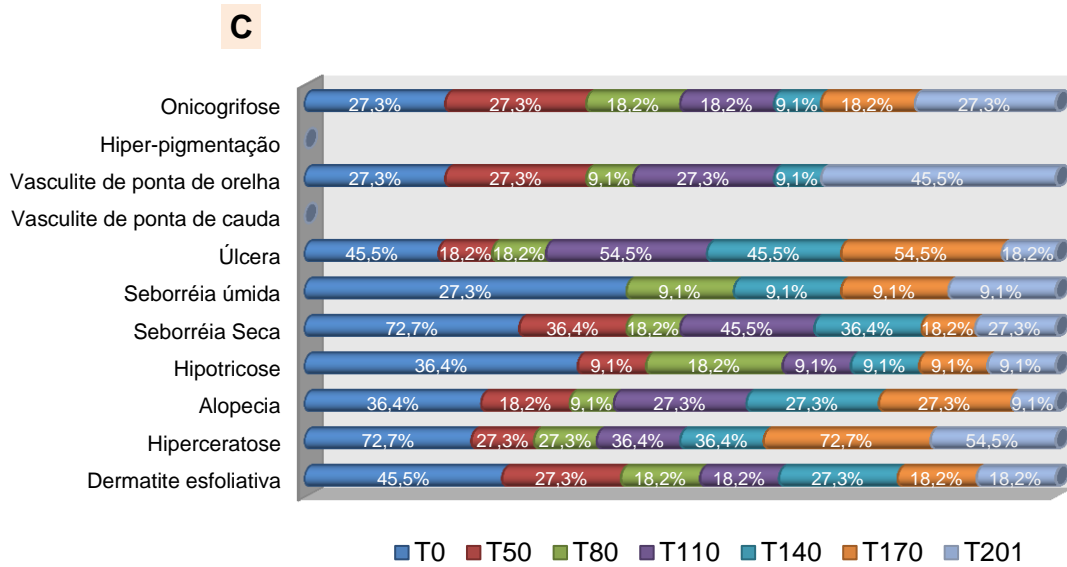


Gráfico 23: Frequência de sinais clínicos dermatológicos relacionados à leishmaniose visceral em cães controle antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T50, T80, T110, T140, T170 e T201).

7.5.3. Alterações histopatológicas da pele da face interna da pina direita

Foram avaliadas, nas biópsias de pele obtidas nos tempos T0, T140 e no fragmento obtido em T201 as seguintes alterações histopatológicas: acantose, hiperkeratose superficial/ ortokeratose, parakeratose, degeneração hidrópica e hialina, papilomatose, espongiose, necrose, úlcera, pérolas córneas, exsudato inflamatório, plasmocitose, presença de granulomas e células gigantes (Figura 3).

Quando comparamos as alterações histopatológicas supracitadas, foi observada diferença estatística, em alguns grupos submetidos ao protocolo terapêutico, quando consideramos o curso do experimento. Assim, os cães tratados com LipV + Alo apresentaram diferença estatística entre os tempos T0 e T140, quando consideramos o quadro de degeneração hidrópica epitelial, com redução de cinco cães acometidos em T0 para apenas um em T140 ($p < 0,0163$). De forma semelhante, foi observada redução desse mesmo processo patológico nos cães tratados somente com alopurinol (Alo), sendo que, os cinco cães afetados em T0 não mais apresentavam essa alteração em T140 ($p < 0,0256$). No mesmo grupo tratado com Alo houve melhora do quadro de hiperkeratose superficial/ folicular e espongiose, com redução de sete cães acometidos em T0 para três em T201 ($p < 0,050$), no caso da hiperkeratose, e com completa remissão do quadro de espongiose em T140 ($P < 0,0385$) mantendo-se até T201 ($P < 0,0385$). No grupo controle, o quadro de acantose apresentou incremento, partindo de um cão acometido em T0 para cinco em T140 ($p < 0,0317$) e seis em T201 ($p < 0,0317$) (Gráfico 24).

Figura 3

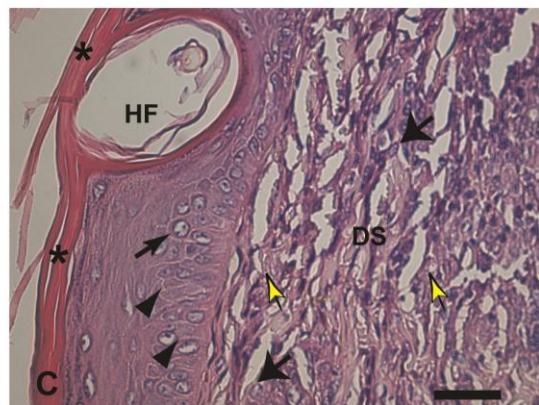
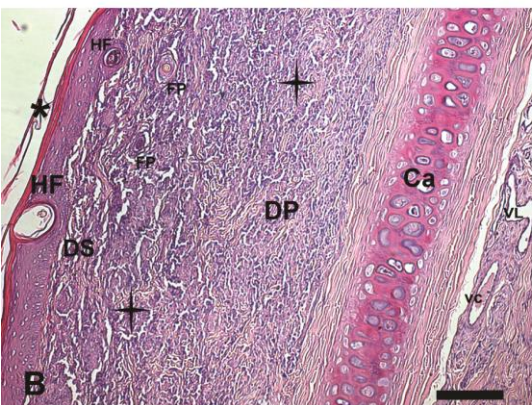
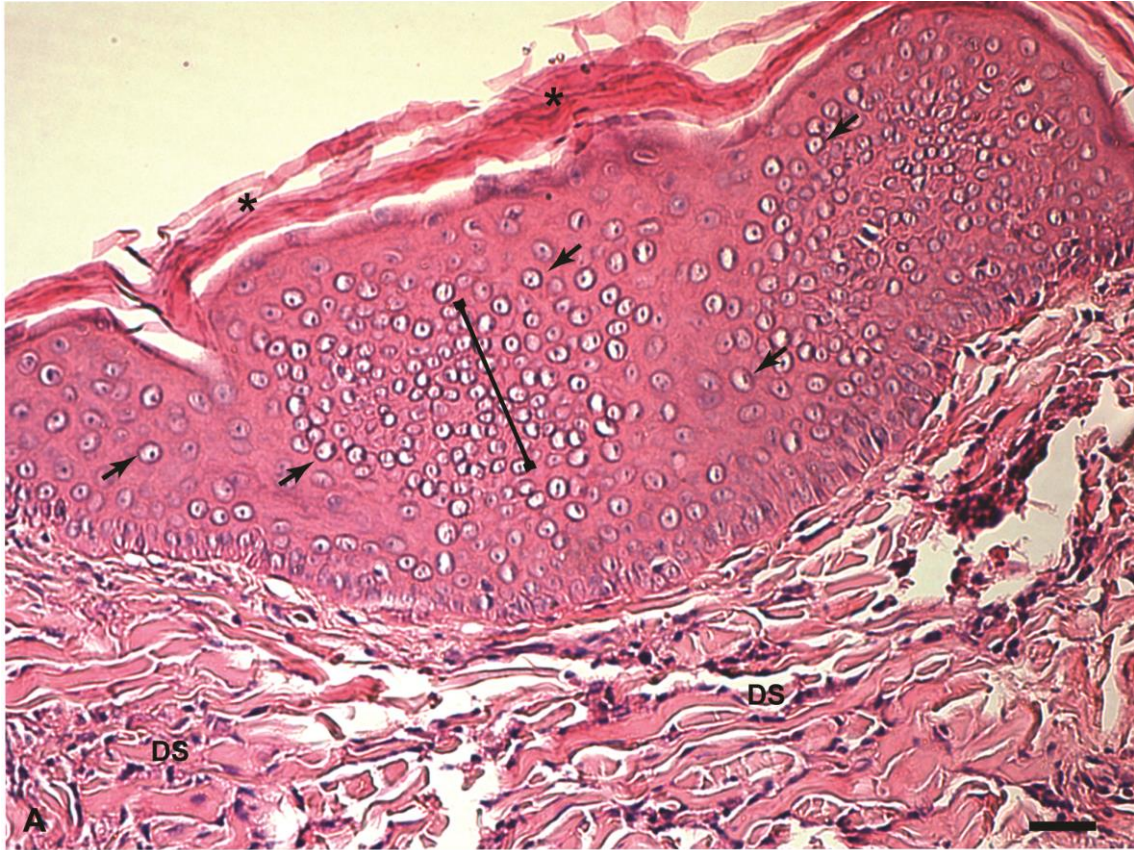


Figura 3: Micrografia da pele de orelha de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*: A) Alterações epidérmicas podem ser evidenciadas como: hiperkeratose/ortokeratose (asterisco), degeneração hidrópica (seta fina); acantose (haste serifada). Hematoxilina–Eosina (HE) (Aumento 100x; Barra=62µm). B) Presença de hiperkeratose/ortokeratose (asterisco) e hiperkeratose folicular (HF) na epiderme. Podemos observar também, infiltrado inflamatório difuso, densamente celularizado (estrela), na derme superficial (DS) e profunda (DP), o qual se estende até próximo à cartilagem (Ca). Vaso linfático (vl), vaso capilar (vc). Hematoxilina–Eosina (HE) (Aumento 100x; Barra=62µm). C) Detalhe da fotomicrografia anterior com alterações epidérmicas tais como: hiperkeratose (asterisco), hiperkeratose folicular (HF), degeneração hidrópica (seta fina) e espongióse (cabeça de seta). Na região da derme superficial (DS) observar presença de infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear (seta larga), com presença de amastigotas (seta amarela). Hematoxilina–Eosina (HE) (Aumento 400x; Barra=16µm).

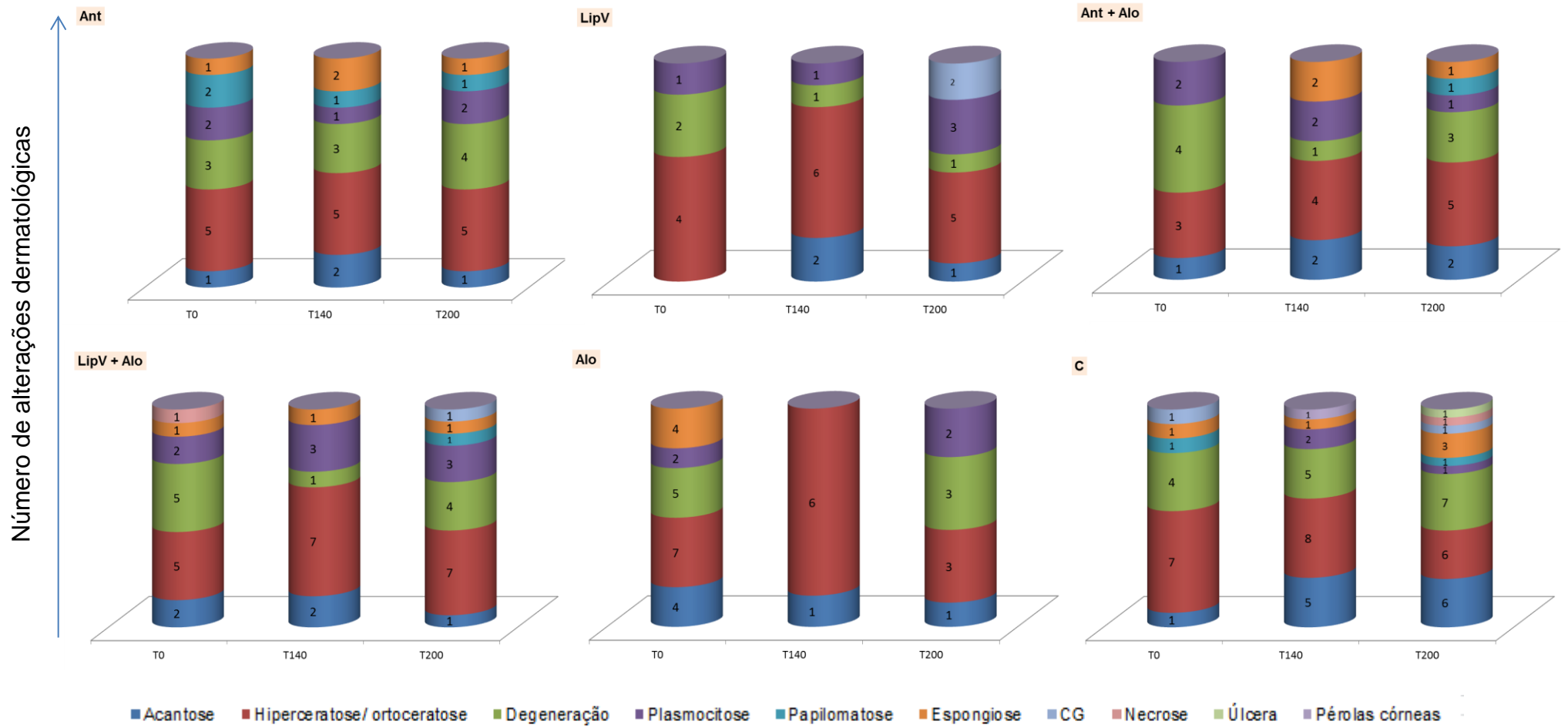


Gráfico 24: Número de cães com alterações histopatológicas dermatológicas relacionadas à leishmaniose visceral submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T140 e T201).

7.5.3.1 Características do exsudato inflamatório

O processo inflamatório foi avaliado para cada grupo experimental, considerando os tempos T0, T140 e T201, sendo que essa classificação se fundamentou no grau de acometimento do infiltrado inflamatório, o tipo celular presente e sua distribuição ao longo da derme superficial e profunda (Tabela 04).

Em geral, em todos os grupos, observou-se dermatite crônica variando de discreta a intensa sendo o exsudato celular predominantemente composto de mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos) localizado preferencialmente ao redor de vasos e anexos da derme profunda. Quando intenso, o exsudato apresentava-se difuso acometendo todas as camadas da derme (Figura 4).

Tabela 4: Avaliação do perfil inflamatório da pele da face interna da pina direita em cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momento da avaliação clínica (T140 e T201)

ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS (n=7)																														
	T0					T140					T201																			
	Grau do infiltrado	Tipo					Distribuição				Grau do infiltrado	Tipo					Distribuição													
		L	H	P	LHP	M	Dif	MF	DS	DP		L	H	P	LHP	M	Dif	MF	DS	DP	L	H	P	LHP	M	Dif	MF	DS	DP	
Ausente	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	5	4	-	5	-	-	3	2	1	5	4	4	-	4	-	-	3	1	1	4	2	2	-	2	-	-	1	1	1	2
++	2	1	-	1	1	-	1	1	2	2	1	1	1	-	-	-	1	-	1	1	2	-	-	-	2	-	-	2	-	2
+++	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0	2	1	-	1	1	-	2	-	2	2	2	-	1	1	1	-	1	1	2	2
Total	7										7										7									
LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS VAZIOS (n=6)																														
Ausente	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	5	5	-	5	-	-	3	2	4	3	1	1	-	1	-	-	-	1	1	-	2	1	1	2	-	-	1	1	2	2
++	1	1	-	1	-	-	1	-	1	1	3	2	-	2	1	-	2	1	2	3	2	-	1	1	-	1	1	1	2	2
+++	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	1	2	-	2	2	1	-	-	-	-	-	1	-	1	1
Total	6										6										6									
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS associado ao ALOPURINOL (n=6)																														
Ausente	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	2	2	-	2	-	-	2	-	1	2	3	3	-	3	-	-	3	-	2	3	3	-	2	3	-	-	1	2	3	3
++	4	3	-	3	1	-	3	1	3	4	1	-	-	-	1	-	1	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	1	1	1
+++	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	6										6										6									

Grau do infiltrado: (+) discreto; (++) moderado; (+++) intenso. Tipo: L (linfocitário); H (histiocitário); P (plasmocitário); LHP (linfohistioplasmocitário); M (misto). Distribuição: Dif (difusa); MF (multi-focal); DS (derme-superficial); DP (derme profunda).

Tabela 5: Avaliação do perfil inflamatório da pele da face interna da pina direita em cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e no momento da avaliação clínica (T140 e T201)

LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS VAZIOS associado ao ALOPURINOL (n=8)																																	
	T0										T140										T201												
	Grau do infiltrado	Tipo					Distribuição					Grau do infiltrado	Tipo					Distribuição					Grau do infiltrado	Tipo					Distribuição				
		L	H	P	LHP	M	Dif	MF	DS	DP	L		H	P	LHP	M	Dif	MF	DS	DP	L	H		P	LHP	M	Dif	MF	DS	DP			
Ausente	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	3	3	-	3	-	-	3	-	2	2	2	-	-	-	2	-	2	-	-	2	4	-	2	3	1	-	3	1	2	4			
++	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	3	-	4	2	-	2	4	2	6	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1			
+++	3	-	-	-	2	1	3	-	3	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	1	1	1			
Total	8											8											8										
ALOPURINOL (n=8)																																	
Ausente	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	3	2	-	3	-	-	2	1	-	3	4	3	1	3	-	-	3	1	-	4	4	2	2	3	-	-	1	3	1	4			
++	2	2	2	-	-	-	2	-	2	2	2	1	-	1	1	-	-	2	2	2	1	-	1	1	-	-	1	-	-	1			
+++	2	-	1	1	1	-	2	-	2	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Total	8											8											8										
CONTROLE (n=11)																																	
Ausente	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
+	5	5	-	5	-	-	3	2	2	5	3	1	-	1	2	-	2	1	-	3	2	-	2	1	-	-	-	2	-	2			
++	2	1	-	1	1	-	2	-	-	2	3	-	1	1	2	-	1	2	-	3	1	-	1	1	-	-	1	-	1	1			
+++	1	-	-	-	1	-	1	-	1	1	4	2	2	-	1	1	4	-	1	3	6	-	5	5	-	1	3	3	4	6			
Total	11											11											11										

Grau do infiltrado: (+) discreto; (++) moderado; (+++) intenso. Tipo: L (linfocitário); H (histiocitário); P (plasmocitário); LHP (linfohistioplasmocitário); M (misto). Distribuição: Dif (difusa); MF (multi-focal); DS (derme-superficial); DP (derme profunda).

Figura 4

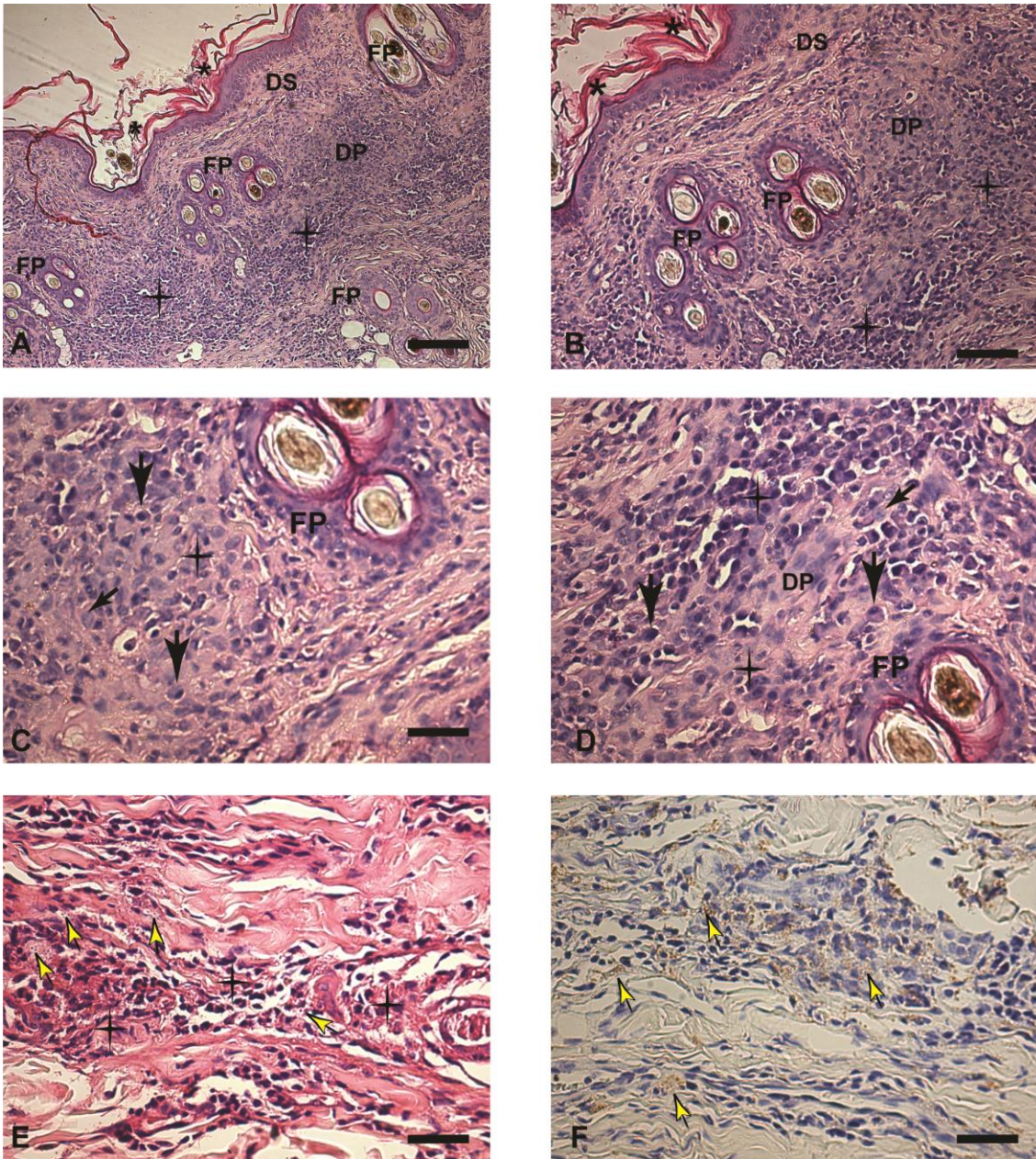


Figura 4: Micrografia da pele de orelha de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*: A) Presença de hiperkeratose/ ortokeratose na face externa da epiderme (asterisco). Na região da derme observar infiltrado inflamatório difuso densamente celularizado (estrela), distribuído na derme superficial (DS) e derme profunda (DP), principalmente próximo aos folículos pilosos (FP). Hematoxilina-Eosina (HE) (Aumento 100x; Barra=62µm). B) Detalhe da figura anterior evidenciando: hiperkeratose/ortokeratose (asterisco), infiltrado inflamatório difuso densamente celularizado (estrela), disposto predominantemente na derme profunda (DP) ao redor e abaixo dos folículos pilosos (FP). Hematoxilina-Eosina (HE) (Aumento 200x; Barra= 32µm). C) Infiltrado inflamatório crônico (estrela) composto por plasmócitos (seta larga) e macrófagos (seta fina) na derme profunda (DP) próximo ao folículo piloso (FP). D) Observe a plasmocitose (seta larga) e alguns macrófagos (seta fina). Hematoxilina-Eosina (Aumento 400x; Barra=16µm). E) Presença de amastigotas de *Leishmania* no citoplasma de células mononucleares (seta amarela). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento 400x; Barra=16µm). F) Presença de amastigotas imunomarcadas (seta amarela). IHQ-Estreptoavidina-Peroxidase (Aumento 400x; Barra= 16µm).

Quando avaliamos o perfil inflamatório descrito na tabela anterior (Tabela 4), ao longo do tempo, dentro do mesmo grupo experimental, verificamos que houve diferença estatística para os grupos LipV; Ant + Alo; Alo e C. Os grupos LipV e C apresentaram incremento do grau de inflamação; sendo que, para o grupo LipV, a média obtida no momento T140 ($\bar{x} = 3,167 \pm 0,752; p < 0,029$) foi estatisticamente superior à média obtida em T0 ($\bar{x} = 2,167 \pm 0,408$), para o grupo controle (C) essa diferença ocorreu no momento T201 ($\bar{x} = 3,00 \pm 1,265; p < 0,043$) quando comparado à média obtida em T0 ($\bar{x} = 2,090 \pm 0,943$). Contrariamente a essa tendência, os grupos Ant + Alo e Alo apresentaram decréscimo do grau de inflamação ao longo do experimento; sendo que, para ambos as médias obtidas em T201 (*Ant + Alo* $\bar{x} = 1,830 \pm 0,752$; *Alo* $\bar{x} = 1,750 \pm 0,707; p < 0,034$), foram inferiores às observadas no primeiro momento de avaliação (T0) (*Ant + Alo* $\bar{x} = 2,667 \pm 0,516$; *Alo* $\bar{x} = 2,650 \pm 1,060$).

A avaliação entre os grupos, no mesmo período de tempo, demonstrou que, no período T140, o grupo tratado somente com alopurinol (Alo) ($\bar{x} = 2,00 \pm 0,755$) apresentou grau de infiltrado inflamatório, na pele da pina direita, estatisticamente inferior quando comparado ao perfil apresentado pelos grupos LipV ($\bar{x} = 3,167 \pm 0,752; p < 0,0071$); LipV + Alo ($\bar{x} = 2,750 \pm 0,462; p < 0,0215$) e C ($\bar{x} = 2,909 \pm 1,040; p < 0,0260$). Considerando o último momento de avaliação (T201), o grupo Alo ($\bar{x} = 1,750 \pm 0,707$) manteve a diferença em relação ao grupo C ($\bar{x} = 3,00 \pm 1,265; p < 0,021$) e apresentou média estatisticamente inferior quando comparada a obtida para o grupo Ant ($\bar{x} = 2,714 \pm 1,113; p < 0,031$). De forma semelhante, o grupo Ant + Alo ($\bar{x} =$

$1,833 \pm 0,752; p < 0,002$) apresentou grau de inflamação reduzido quando comparado ao obtido para o grupo controle (C) ($\bar{x} = 3,00 \pm 1,265$) (Gráfico 25).

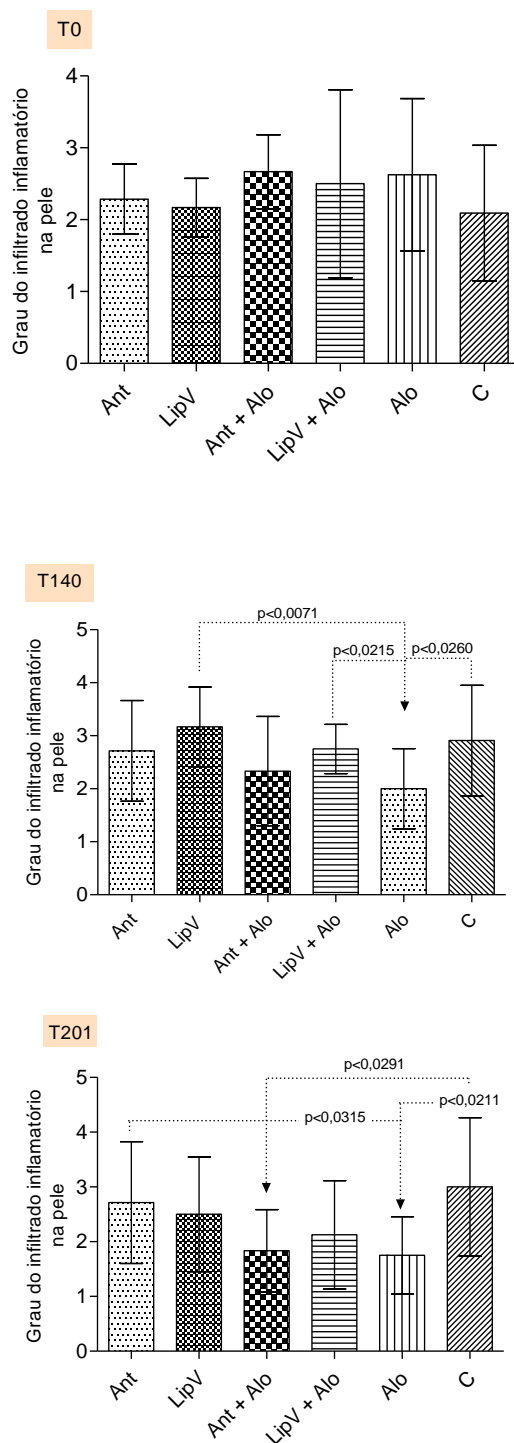


Gráfico 25: Grau de infiltrado inflamatório na pele da face interna da pina direita dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T140 e T201). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos marcados diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

7.5.3.2 Avaliação da positividade parasitária

A avaliação da positividade parasitária, na pele da face interna da pua direita, foi avaliada pelo método imuno-histoquímico (IHQ) da Estreptoavidina-biotina-peroxidase antes do início do tratamento (T0) nos momentos T60, T140 e T201. Somente houve diferença estatística nos grupo Ant + Alo e LipV + Alo, sendo que, quando consideramos o último momento de avaliação (T201) somente houve diferença em relação a T0, no grupo tratado com a associação de Ant + Alo (Gráfico 26).

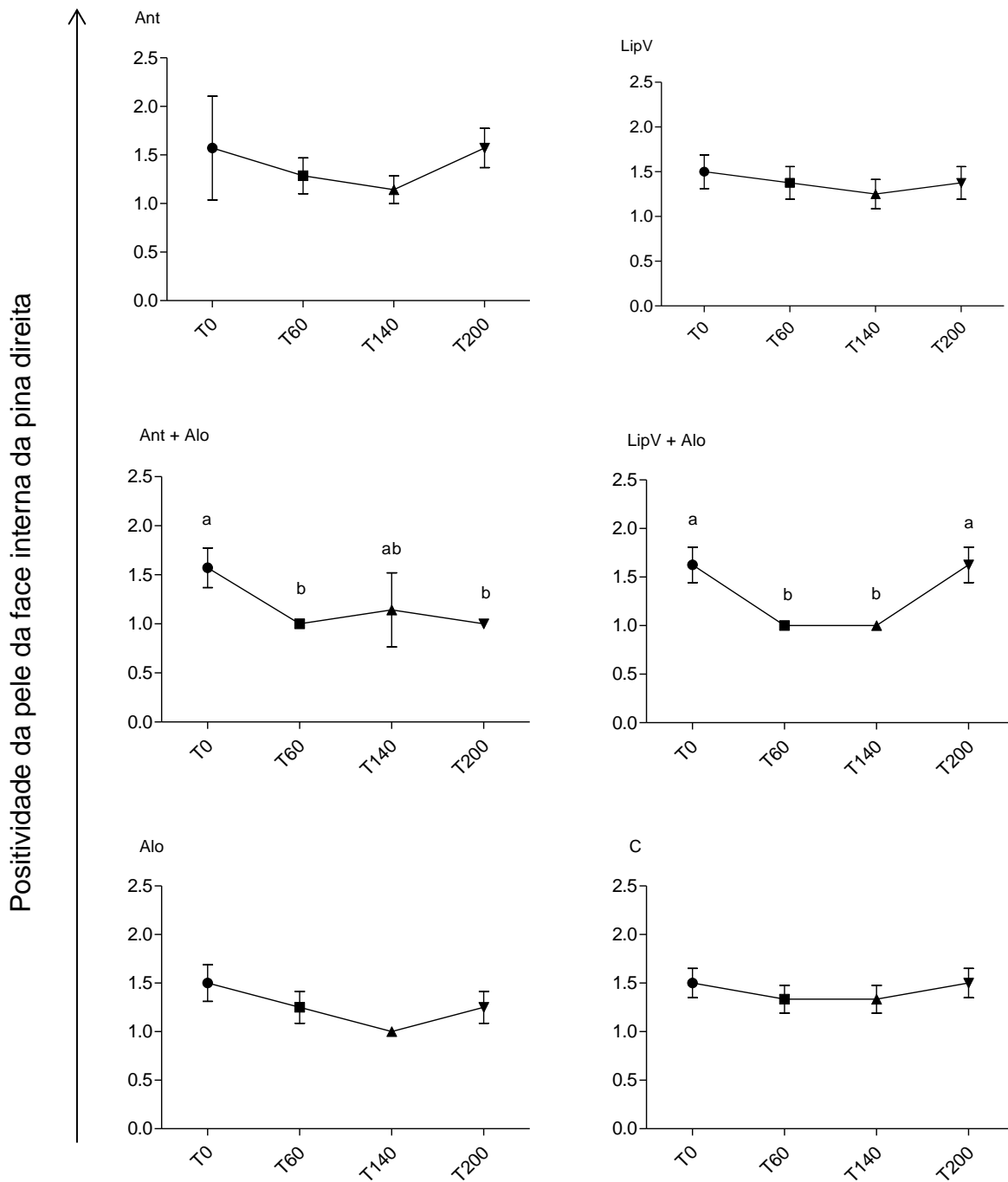


Gráfico 26: Determinação da presença de amastigotas imuno-marcadas na pele da face interna da pina direita de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico antes do tratamento (T0) e nos momentos das avaliações clínicas (T60, T140 e T201), pela técnica da estreptoavidina-peroxidase (IHQ). Ant: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da positividade pela IHQ: 1- ausência de infiltrado; 2- presença de pelo menos uma amastigota de *L. chagasi*. Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b), diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

FÍGADO

7.6. Peso relativo (g/ 100g p.v)

Quando avaliamos o peso relativo do fígado, nos cães experimentais, observamos que as médias obtidas para os grupos tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (Ant) e somente com alopurinol (Alo) apresentaram-se estatisticamente inferiores ao valor obtido para o grupo LipV ($p < 0,041$ e $p < 0,020$, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 05: Peso relativo (g/100g p.v.) do fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania chagasi*) submetidos ao protocolo terapêutico.

Grupos	PESO RELATIVO DO FÍGADO (g/100g)
Ant	3,06 +/- 0,492 ^b
LipV	4,018 +/- 0,957 ^a
Ant + Alo	3,075 +/- 0,648 ^{ab}
LipV + Alo	3,602 +/- 0,622 ^{ab}
Alo	2,937 +/- 0,437 ^b
C	3,285 +/- 0,882 ^{ab}

Ant (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos) n=7; LipV (lipossomas nanométricos denominados vazios) n=6; Ant + Alo (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol) n=6; Lip V + Alo (lipossomas nanométricos denominados vazios associado ao alopurinol) n=8; Alo (alopurinol) n=8; C (controle) n=11. Diferença estatística, ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), entre as médias do peso relativo do órgão, entre os grupos, são identificadas por letras minúsculas (a, b, c) através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

7.6.1 – Macroscopia

As principais alterações macroscópicas observadas no fígado foram o aumento de peso e volume do órgão configurando hepatomegalia. Por vezes, se apresentava tumefeito, de coloração vermelho escura, deixando fluir grande quantidade de sangue ao corte configurando o quadro de congestão. O exame da superfície do órgão também se encontrava, por vezes, com presença de áreas de coloração brancacenta, difusamente distribuídas na superfície do órgão sugerindo fibrose (Tabela 6).

Tabela 06: Alterações macroscópicas no fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania Leishmania chagasi* submetidos ao protocolo terapêutico.

GRUPOS	ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS DO FÍGADO							
	Aparentemente normal	Hepatomegalia	Bordas abauladas	Fibrose	Aderência de cápsula	Degeneração	Congestão	Teste de colédoco negativo
Ant	42,8%	-	-	14,3%	-	14,3%	28,5%	-
LipV	50%	16,6%	16,6%	16,6%	-	16,6%	16,6%	-
Ant + Alo	83,3%	-	-	-	-	16,7%	-	-
LipV + Alo	12,5%	-	-	25%	-	37,5%	50%	12,5%
Alo	37,5%	-	-	12,5%	12,5%	25,0%	12,5%	-
C	54,5%	9,09%	9,09%	-	-	27,2%	18,2%	-

Ant (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos) n=7; LipV (lipossomas nanométricos denominados vazios) n=6; Ant + Alo (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol) n=6; Lip V + Alo (lipossomas nanométricos denominados vazios associado ao alopurinol) n=8; Alo (alopurinol) n=8; C (controle) n=11.

7.6.2 – *Microscopia*

As alterações histopatológicas avaliadas no fígado foram: espessura capsular; congestão sinusoidal e dos grandes vasos da Tríade Portal; hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer; exsudato inflamatório sub-capsular, portal e intra-lobular, fenômenos degenerativos e deposição do pigmento hemossiderina associado ao exsudato celular.

O exsudato celular era predominantemente constituído por células mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos) e localizados, como descrito, nos espaço-porta e no lóbulo hepático. Entretanto, no lóbulo hepático, o exsudato formava arranjos especiais em nódulos que na literatura são nominados granulomas intralobulares (Figura 5).

Figura 5

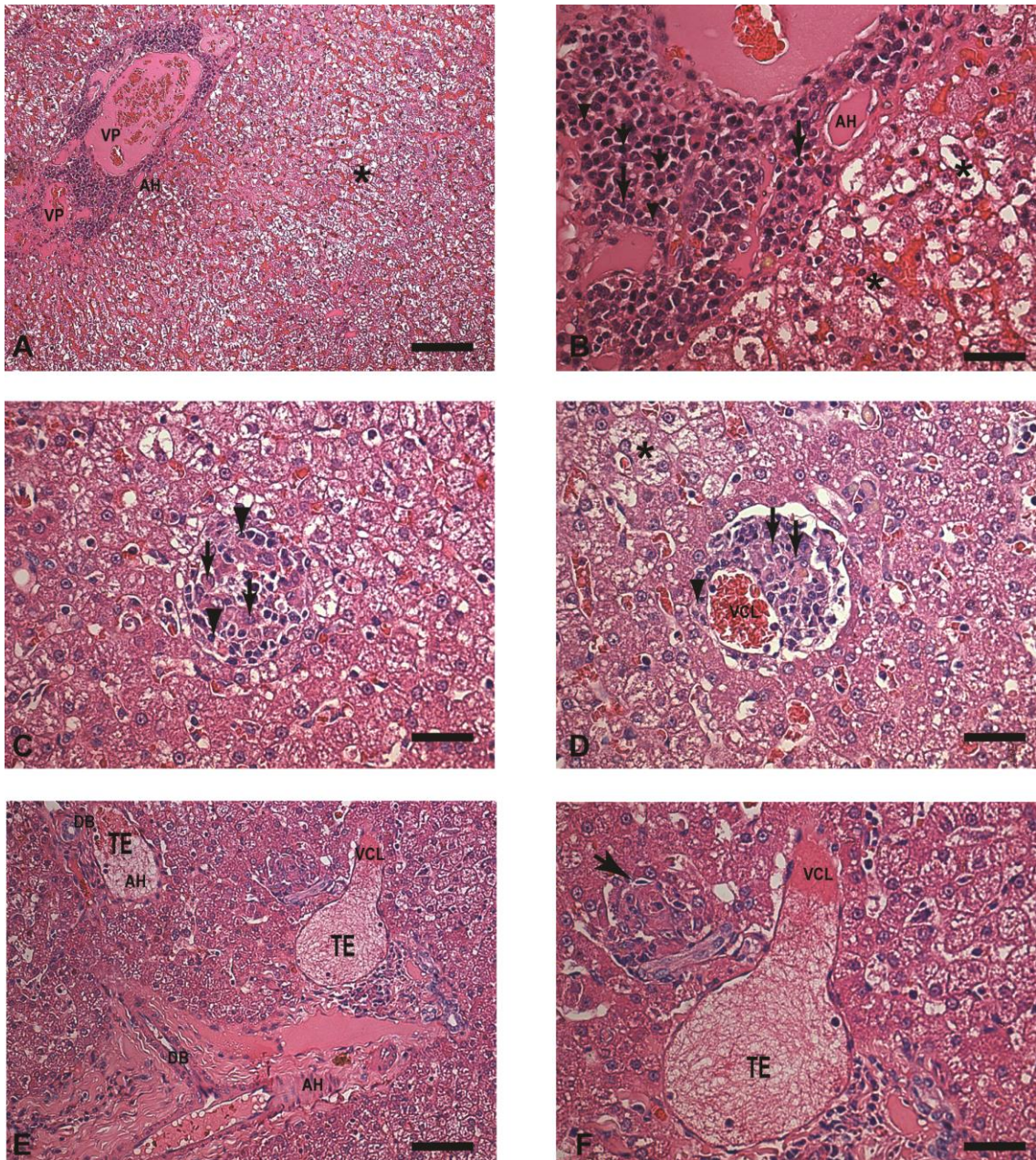


Figura 5: Fragmento de fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Fragmento de fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. A) Nessa fotomicrografia podemos evidenciar espaço porta, no qual podemos verificar ramos da veia porta (VP) e ramo da artéria hepática (AH). Notar infiltrado inflamatório ao redor do espaço porta. No campo direito da figura observar no lóbulo hepático presença de intensa degeneração evidenciada pelos hepatócitos hipocorados (asterisco). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 100x; Barra: 62µm) (B) Detalhes da figura anterior evidenciando infiltrado inflamatório predominantemente plasmocitário (seta larga), linfócitos (seta fina) e macrófagos (cabeça de seta). Observar ao lado, intenso processo degenerativo, sendo que os hepatócitos apresentam aspecto baloniforme e citoplasma hipocorado. Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm). C) Notar formação de granuloma intra-lobular constituído por células epitelióides (seta fina), linfócitos (cabeça de seta) e plasmócitos (seta fina). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm). D) Notar a formação e localização de um granuloma envolvendo a veia centro-lobular (VCL). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm). E) Formação de um trombo-embolo no ramo da artéria hepática (AH) e na veia centro lobular (VCL). Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 100x; Barra: 62µm). F) Detalhe da figura anterior mostrando trombo-embolo predominantemente constituído por rede eosinofílica (fibrina) Hematoxilina-eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm).

Antimoniato (n=7)

Congestão sinusoidal foi observada em cinco cães (71,42%), sendo que três apresentaram quadro discreto e dois apresentaram manifestação moderada. Inflamação intralobular e portal, discreta, foram verificadas em dois cães (28,57%), respectivamente; ao passo, que outro cão (14,28%) apresentou moderada hiperplasia e hipertrofia do sistema mononuclear fagocitário (SMF), representada principalmente pela células de Kupffer. Granulomas intralobulares foram observados em quatro casos (42,85%), sendo três de forma discreta e outro moderada. Degeneração hidrópica discreta a moderada foi verificada em um (14,28%) e três (42,85%) cães, respectivamente; sendo que, outro cão apresentou degeneração gordurosa discreta.

Lipossomas vazios (n=6)

Congestão sinusoidal foi observada em cinco cães (83,33%), sendo que três apresentaram quadro discreto e dois apresentaram manifestação intensa. Inflamação intralobular e portal foram observadas em todos os cães (100%), sendo que, quatro apresentaram manifestação discreta e dois grau moderado a intenso. Granulomas intralobulares foram observados em todos os cães (100%), de forma discreta a intensa, sendo que, em quatro evidenciou-se nítida hiperplasia e hipertrofia do SMF. Degeneração hidrópica variou de discreta a intensa em quatro cães (66,66%).

Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol (n=6)

Em três cães (50%), observou-se reforço da parede celular devido à deposição de fibras colágenas na parede dos capilares sinusoidais e ao redor de hepatócitos sugerindo a fibrose difusa descrita por Rogers em 1906 no Kalazar indiano e no cão por Tafuri et al. (1996). Nesses cães, conjuntamente foi observado quadro de congestão moderada, degeneração baloniforme intensa e difusa promovendo compressão dos sinusoides (sinusoides exangues). Granulomas intralobulares foram observados de forma discreta em dois animais. Áreas multifocais de necrose de coagulação foram observadas em um destes animais.

Outros três cães (50%) apresentaram congestão discreta, com áreas multifocais de infiltrado inflamatório misto, tanto na região portal quanto no espaço intra-lobular. Este foi discreto em dois animais e intenso e coalescente em outro, com áreas multifocais de necrose de coagulação.

Lipossomas vazios e alopurinol (n=8)

Congestão sinusoidal foi observada em sete dos oito cães (87,5%), sendo que desses, seis apresentaram grau moderado e um grau intenso de apresentação. Exsudato inflamatório sub-capsular e portal, moderado, foram observados em um (12,5%) e três (37,5%), respectivamente. Raros granulomas, não confluentes, foram identificados em quatro cães (50%), ao passo que em outro animal do grupo a manifestação ocorreu de forma moderada. Degeneração celular hidrópica discreta, moderada e intensa, foi

observada em um (12,5%), dois (25,5%) e um cão (12,5%), respectivamente. Sendo que, em um desses cães observou-se esteatose associada.

Em um cão, observaram-se mudanças no padrão reticular com reforço da parede celular dos hepatócitos, sugerindo a fibrose de Rogers.

Alopurinol (n=8)

Congestão sinusoidal foi observada em seis (75%) dos oito cães, sendo que desses, um apresentou quadro discreto, ao passo que o restante apresentou quadro moderado. Quando consideramos a presença de inflamação, essa foi observada em um cão (12,5%) situado na região sub-capsular, de forma discreta, e em dois cães (25%) no espaço porta, também de forma discreta. Hipertrofia do SMF, discreta a moderada, foi evidenciada em cinco animais (62,5%). Presença de granulomas, no lúmen sinusoidal, foi observada em dois cães (25%) de forma moderada. Degeneração celular hidrópica ou baloniforme foi notada em seis animais do grupo (75%), com grau de manifestação moderada em quatro e intenso em dois cães. Quatro desses cães também apresentaram esteatose associada, e outros dois cães apresentaram apenas a degeneração gordurosa.

Controle (n=11)

Congestão sinusoidal foi observada em oito (72,72%) dos onze cães avaliados. Quando consideramos sua intensidade de manifestação, essa variou de discreta, em um cão, moderada em seis e intensa no outro.

Hiperplasia e hipertrofia do SMF foram observadas, de forma moderada a intensa, em quatro cães (36,36%). Inflamação portal foi identificada em cinco dos onze cães (45,45%), variando de discreta em um a intensa no restante. Raros granulomas foram notados em três cães (27,27%), enquanto em dois esses se manifestaram de forma intensa (18,18%). Degeneração hidrópica difusa discreta, moderada e intensa foi observada em dois (18,18%), um (9,09%) e dois cães (18,18%), respectivamente. Dois cães apresentaram, no interior, dos capilares sinusoidais, assim como na luz de grandes vasos portais e centrolobulares, deposição de grumos e/ ou filamentos róseos de fibrina em várias direções, entre as hemácias, estando aderidos à parede endotelial, sugestivo de formação de trombos. Um cão não apresentou quaisquer das alterações supracitadas.

Degeneração hidrópica

Considerando que o quadro de degeneração hidrópica esteve presente em muitos grupos e em alguns de forma intensa, fez-se necessário avaliar as médias obtidas para cada grupo. A análise das médias fornecidas pela avaliação semi-quantitativa do quadro de degeneração hidrópica revelaram que os cães tratados com Alo, assim como os tratado com a associação Ant + Alo apresentaram as maiores médias $\bar{x} = 2,75 \pm 1,65$ e $\bar{x} = 2,66 \pm 1,50$; *respectivamente*; ao passo que, o grupo C e o grupo tratado somente com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (Ant) apresentaram as menores médias ($\bar{x} = 1,90 \pm 1,22$ e $\bar{x} =$

$2,00 \pm 1,00$; respectivamente). Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos (Gráfico 27).

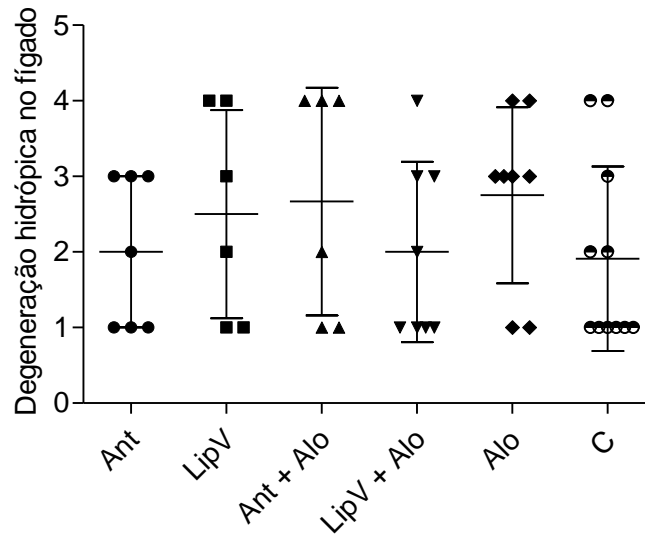


Gráfico 27: Grau de degeneração hidrópica no fígado dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

Granulomas intralobulares

Considerando que houve a formação de granulomas intralobulares na grande maioria dos cães analisados, formando nódulos isolados, por vezes confluentes, e também por vezes obliterando a luz dos sinusóides, fez-se necessário avaliar as médias obtidas para cada grupo.

A análise das médias fornecidas pela avaliação semi-quantitativa do número de granulomas revelou que o grupo LipV apresentou médias superiores ($\bar{x} = 3,167 \pm 0,752$) quando comparada aquelas verificadas para os demais grupos ((*Ant* $\bar{x} = 1,71 \pm 0,755$; *Ant + Alo* $\bar{x} = 1,66 \pm 0,516$; *LipV + Alo* $\bar{x} = 1,75 \pm 0,70$; *Alo* $\bar{x} = 1,50 \pm 0,925$; *C* $\bar{x} = 1,81 \pm 1,16$), com $p < 0,01$.

(Gráfico 28).

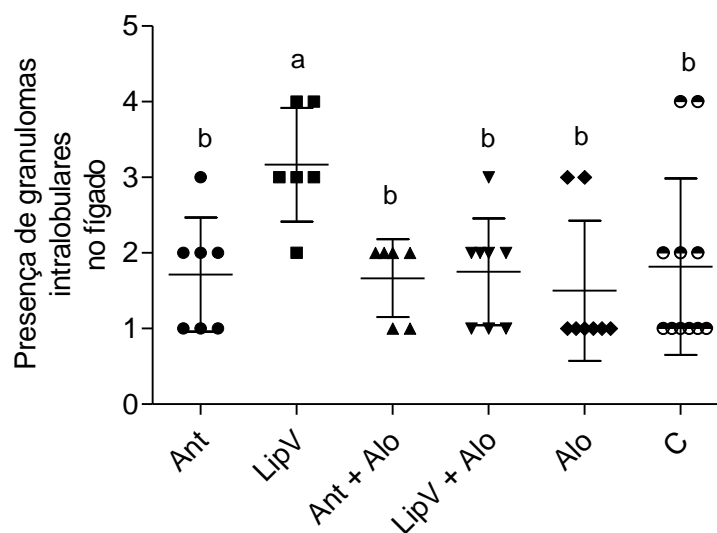


Gráfico 28: Presença de granulomas intralobulares no fígado dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. Ant: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b) diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

BAÇO

7.8. Peso relativo do baço (g/ 100g p.v)

Quando avaliamos o peso relativo do baço (Tabela 7), nos cães experimentais, observamos que a média obtida para grupo duplamente tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (Ant + Alo) foi estatisticamente inferior quando comparada ao grupo Alo e controle (C), com $p < 0,0424$ e $p < 0,0282$, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os outros grupos (Tabela 7).

Tabela 07: Peso relativo (g/100g) do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania Leishmania chagasi* submetidos ao protocolo terapêutico.

Grupos	PESO RELATIVO DO BAÇO (g/100g)
Ant	0,508 +/- 0,218 ^{ab}
LipV	0,738 +/- 0,411 ^{ab}
Ant + Alo	0,392 +/- 0,122 ^b
LipV + Alo	0,617 +/- 0,260 ^{ab}
Alo	0,678 +/- 0,245 ^a
C	0,709 +/- 0,238 ^a

Ant (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos) n=7; LipV (lipossomas nanométricos denominados vazios) n=6; Ant + Alo (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol) n=6; Lip V + Alo (lipossomas nanométricos denominados vazios associado ao alopurinol) n=8; Alo (alopurinol) n=8; C (controle) n=11. Diferença estatística, ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), entre as médias do peso relativo do órgão, entre os grupos, são identificadas por letras minúsculas (a, b, c, d) através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

7.8.1 – Macroscopia

A hipertrofia foi avaliada pela análise macroscópica baseada no tamanho do órgão considerando nossa experiência comparativa ao grupo controle. Este resultado pode ser confirmado pelo peso relativo descrito anteriormente. Aspecto rugoso caracterizado por superfície irregular, sempre associado à hipertrofia e espessura da cápsula, denunciada pela cor brancenta e opaca na superfície do órgão. Hipertrofia de polpa branca evidenciada pela presença de numerosos pontos brancos distribuídos, difusamente, pelo parênquima. Congestão foi evidenciada pela coloração vermelho escuro do órgão, deixando fluir sangue na superfície de corte (Tabela 8).

Tabela 8: Alterações macroscópicas no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* submetidos ao protocolo terapêutico.

GRUPOS	ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS DO BAÇO						
	Aparentemente normal	Hipertrofia	Superfície irregular	Aderência de cápsula	Bordas abauladas (oblongas)	Hiperplasia e hipertrofia de polpa branca	Congestão
Ant	28,57%	28,57%	-	57,14%	28,57%	14,28%	42,85%
LipV	-	50,0%	16,6%	100%	50,0%	50%	16,6%
Ant + Alo	60%	20%	20%	40%	20%	20%	20%
LipV + Alo	25%	12,5%	12,5%	75%	12,5%	12,5%	12,5%
Alo	25%	50%	37,5%	62,5%	50%	37,5%	37,5%
C	9,09%	54,54%	9,09%	45,45%	54,54%	9,09%	45,45%

Ant (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos) n=7; LipV (lipossomas nanométricos denominados vazios) n=6; Ant + Alo (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol) n=6; Lip V + Alo (lipossomas nanométricos denominados vazios associado ao alopurinol) n=8; Alo (alopurinol) n=8; C (controle) n=11.

7.8.2 – *Microscopia*

As alterações histopatológicas no baço de todos os casos foram: espessamento capsular, assim como exsudato inflamatório capsular e sub-capsular; alterações do volume e número dos constituintes da polpa branca, reatividade da zona B dependente; espessamento dos cordões de Billroth; congestão sinusoidal (Figura 6).

Figura 6

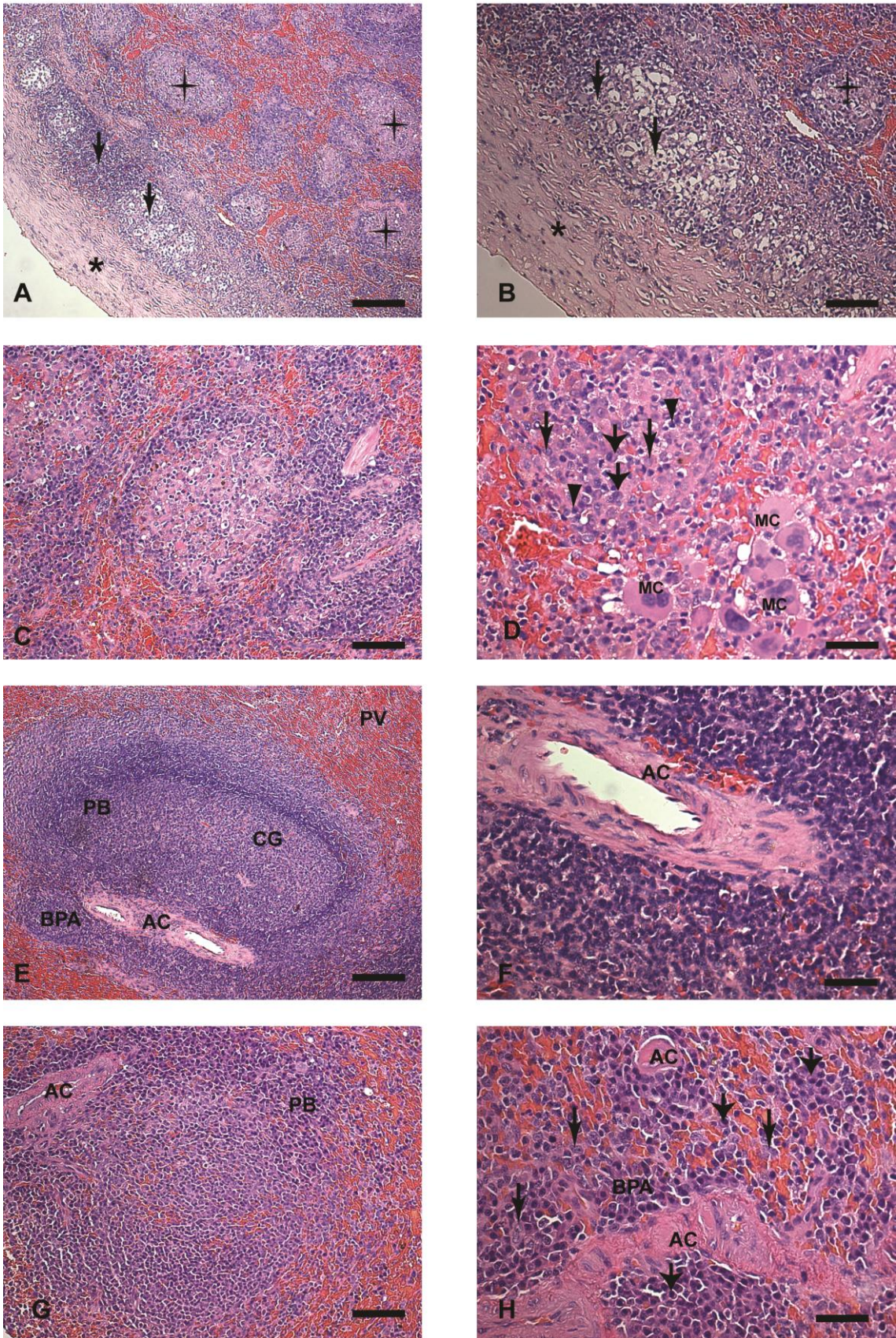


Figura 6: Fragmento de baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. (A) Fotomicrografia panorâmica evidenciando cápsula espessa (asterisco). Na região subcapsular observa-se a presença de infiltrado inflamatório densamente celularizado difuso composto por linfócitos e macrófagos (seta fina). No parênquima esplênico observar formações nodulares (estrela). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 100x; Barra: 62µm). (B) Detalhe da figura anterior com macrófagos de aspecto vacuolado na região subcapsular (seta fina) contendo inúmeras formas de *Leishmania*. Granuloma evidenciado no parênquima (estrela). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 100x; Barra: 62µm). (C) No centro da figura detalhe da formação de um granuloma constituído por células mononucleares. Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 200x; Barra: 32µm). (D) Detalhe da figura anterior, granuloma composto por macrófagos (seta fina), por plasmócitos (seta larga) e por linfócitos (cabeça de seta), abaixo se observa mega cariócitos (MC). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 400x; Barra: 16µm). (E) Polpa branca (PB) reativa com hiperplasia e hipertrofia do nódulo linfóide, com formação de centro germinativo (CG). Observar também reatividade da bainha periarteriolar (BPA), ao lado da arteriola central da polpa branca (AC). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 400x; Barra: 16µm). (F) Detalhe da figura anterior onde podemos evidenciar ao redor da arteríola central da polpa branca (AC) grande quantidade de linfócitos. Hematoxilina-Eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm). (G) Fotomicrografia da polpa branca (PB) não reativa com ausência de centro germinativo e área T dependente. Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 400x; Barra: 16µm). (H) Detalhe da figura anterior, área T dependente (BPA) substituída por inúmeros plasmócitos (seta larga) e macrófagos (seta fina). Hematoxilina-Eosina (HE) (Aumento: 400x; Barra: 16µm,).

Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos

Espessamento da cápsula foi observado em dois (28,57%) dos sete cães, sendo que, em um desses também se observou infiltrado inflamatório do tipo mononuclear, densamente celularizado, disposto de forma difusa. Depleção de polpa branca, especificamente na região correspondente à área T dependente, foi observada em cinco animais (62,5%), quanto à intensidade de apresentação três apresentaram grau moderado de depleção, ao passo que, outros dois apresentaram intensa depleção. A região correspondente à área B apresentou-se intensamente reativa em apenas um dos animais (14,28%), enquanto que, nos outros seis (85,71%) não se observou qualquer evidência de centro germinativo. Todos os cães (100%) apresentaram hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha variando de discreta a moderada. Granulomas constituídos por macrófagos de cromatina frouxa, citoplasma vacuolizado e hipocorado, não raro parasitados com amastigotas de *Leishmania* (granuloma de “Wirchow”), foram observados em cinco (71,42%) animais variando de discreta a moderada. Plasmócitose, por vezes formando verdadeiros cordões na polpa vermelha foram observados em um animal (14,28%). Muitas vezes a formação dos chamados Corpúsculos de Russell (degeneração hialina) caracterizados pela eosinofilia do citoplasma dos plasmócitos eram observados.

Lipossoma vazio

Espessamento capsular foi observado em dois (33,3%) dos seis cães, sendo que todos os animais do grupo (100%) apresentaram periesplenite de intensidade moderada a intensa, multi-focal a difusa, do tipo mononuclear.

Associado a esse quadro, áreas multifocais, sub-capsulares, de agregados de macrófagos vacuolados, vesiculosos, com limites pouco precisos foram observados em três (50%) animais, muitos dos quais apresentavam em seu interior amastigotas de *L. chagasi*.

Depleção da polpa branca, área T, foi observada em todos (100%) os animais variando de discreta, moderada a intensa em um, quatro e um cão, respectivamente. Dois desses cães (33,3%) apresentaram moderada reatividade da zona B dependente. Hiperplasia e hipertrofia dos cordões de Billroth com presença de granulomas “frouxos” do tipo Wirchowiano foi observado em todos os cães (100%) de forma discreta a intensa. Cordões de plasmócitos, ao longo do parênquima esplênico, foram notados em dois (33,33%) animais. Em um animal (16,66%) evidenciou-se área focal de necrose de coagulação.

Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associados ao alopurinol (n=6)

Espessamento capsular focal foi observado em um animal (16,66%), sendo que área focal de inflamação do tipo mononuclear, discreta, foi observada em três cães (50%). A depleção da área T dependente da polpa branca foi discreta em quatro (66,6%) dos seis cães e moderada em dois cães (33,33%). Associado ao primeiro grupo observou-se discreta e moderada reatividade da zona B em três cães e um cão, respectivamente. Polpa vermelha apresentou-se hiperplásica a hipertrófica em todos os cães variando de discreta a moderada, sendo que em todos se observou

formações granulomatosas do tipo Wirchowiano. Plasmocitose foi evidenciada em um animal (16,66%) de forma moderada.

Lipossoma vazio associado ao alopurinol (n=8)

Periesplenite capsular foi observada em quatro (50%) dos oito cães variando de discreta a intensa e focal ou difusa. Em geral, quando discreta esta se apresentava de forma focal ou multifocal, ao passo que quando intensa esta se apresentava de forma difusa. Depleção da área T da polpa branca foi evidenciada em todos os cães (100%), variando de discreta, moderada à intensa em dois, cinco e um cão, respectivamente. Ausência de reatividade da zona B da polpa branca foi observada em cinco cães (62,5%), enquanto reatividade discreta e intensa foi observada em dois e um cão, concomitantemente. Hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha, foi ressaltada em todos os cães, variando de discreta a intensa. Trabéculas esplênicas, irregularmente espessadas, por incremento do tecido conjuntivo intersticial foi observado em um animal (12,5%).

Alopurinol (n=8)

Cápsula espessada associada à exsudato inflamatório do tipo mononuclear, discreto e multifocal foi observada em dois (25%) dos oito cães. Depleção linfocitária da área T foi observada sete cães (87,5%), sendo que um, cinco e outro cão apresentaram intensidade variando de discreta, moderada e intensa, respectivamente. Contrariamente a essa lesão de hipoplasia linfoide observou-se reatividade da área B da polpa branca em

sete cães, sendo essa, de forma discreta em um, moderada em quatro e intensa em dois cães. Hiperplasia dos cordões de Billroth foi observada em seis cães variando de discreta a intensa apresentando, conjuntamente, granulomas. Trabéculas esplênicas, irregularmente espessadas, por incremento do tecido conjuntivo intersticial foram observadas em quatro animais (50%).

Um cão não foi observado qualquer alteração histológica (12,5%).

Controle (n=9)

Cápsula espessada foi observada em um (11,1%) dos nove cães, sendo que periesplenite moderada, difusa e constituída predominantemente por células mononucleares foi evidenciada em três cães (33,33%). Hipoplasia linfóide da área T foi observada em todos os cães (100%), a qual variou de moderada, em sete cães, a intensa no restante. Todavia, não foi observado nenhum caso com reatividade da área B dependente (formação de centros germinativos). Polpa vermelha hipertrófica e hiperplásica foi observada em todos os cães (100%), se manifestando de forma discreta em dois animais; moderada em quatro e intensa em três. Células plasmáticas com formação dos Corpúsculos de Russel foram observadas em três cães (33,33%).

Depleção da área T dependente no baço

Considerando que o quadro de depleção da área T dependente no baço esteve presente em muitos cães, de forma moderada a intensa, torna-se necessária a avaliação das médias obtidas para cada grupo.

A análise das médias fornecidas pela avaliação semi-quantitativa do quadro de depleção da área T dependente, na polpa branca, revelaram que os cães do grupo Ant + Alo, Ant e Alo apresentaram as menores médias ($\bar{x} = 2,667 \pm 1,033$; $\bar{x} = 2,714 \pm 1,254$ e $\bar{x} = 2,750 \pm 0,886$; *respectivamente*).

Contrariamente, os grupos LipV e controle (C) apresentaram as maiores médias indicativas de depleção ($\bar{x} = 3,00 \pm 0,632$ e $\bar{x} = 3,364 \pm 0,5045$; *respectivamente*).

Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos (Gráfico 30).

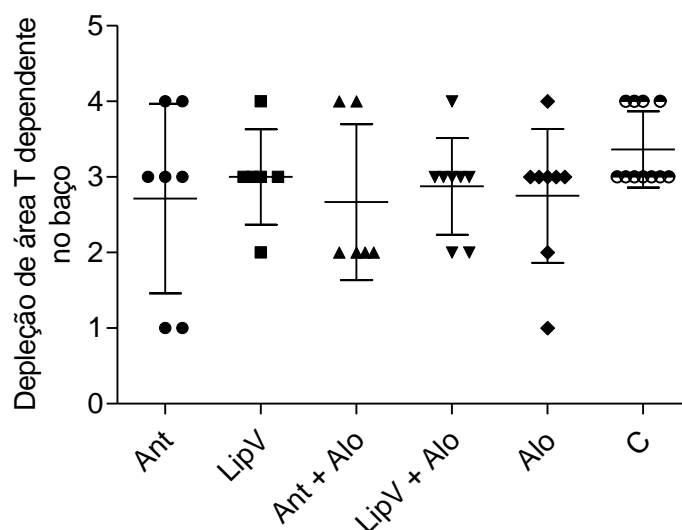


Gráfico 30: Grau de depleção da área T dependente no baço dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. Ant: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

7.8.3 – Avaliação da densidade parasitária no baço

A avaliação da presença de formas amastigotas imuno-marcadas no baço dos cães demonstrou que no grupo tratado com Alo, somente um animal se apresentou positivo, enquanto no grupo Ant + Alo nenhum dos cães avaliados apresentaram positividade pela IHQ. Ambos os grupos quando comparados ao controle (C) apresentaram diferença estatística com $p < 0,0378$ (Gráfico 31).

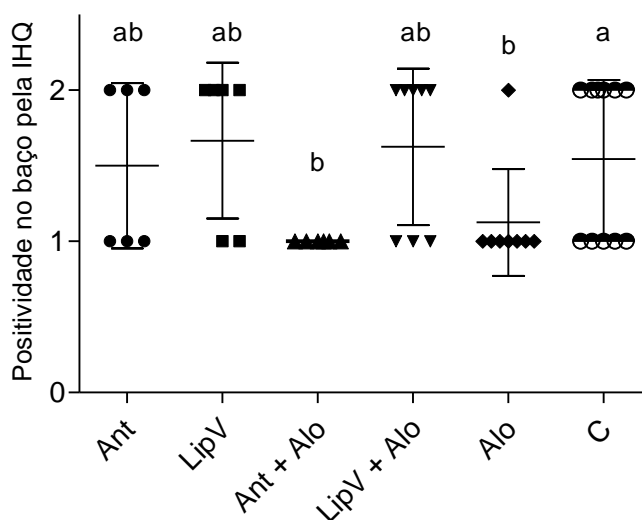


Gráfico 31: Determinação da presença de amastigotas imuno-marcadas no baço de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201, pela técnica da estreptoavidina-peroxidase (IHQ). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da positividade pela IHQ: 1- ausência de infiltrado; 2- presença de pelo menos uma amastigota de *L. chagasi*. Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b) diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

LINFONODO CERVICAL SUPERFICIAL

7.9 Peso relativo (g/ 100g p.v)

Quando consideramos a relação do peso do linfonodo cervical superficial/ peso corporal por 100g de peso vivo (peso relativo g/100g p.v.) verificamos que os grupos tratados com Ant + Alo; LipV + Alo e Alo apresentaram médias dos pesos relativos inferiores aquelas observadas para os outros grupos experimentais. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9: Peso relativo (g/100g) do linfonodo cervical superficial de cães naturalmente infectados com *Leishmania Leishmania chagasi* submetidos ao protocolo terapêutico.

Grupos	PESO RELATIVO DO LINFONODO CERVICAL SUPERFICIAL (g/100g)
Ant	0,018 +/- 0,012
LipV	0,029 +/- 0,029
Ant + Alo	0,009 +/- 0,005
LipV + Alo	0,012 +/- 0,005
Alo	0,012 +/- 0,005
C	0,020 +/- 0,011

Ant (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos) n=7; LipV (lipossomas nanométricos denominados vazios) n=6; Ant + Alo (antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos associado ao alopurinol) n=6; Lip V + Alo (lipossomas nanométricos denominados vazios associado ao alopurinol) n=8; Alo (alopurinol) n=8; C (controle) n=11. Diferença estatística, ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), entre as médias do peso relativo do órgão, entre os grupos, são identificadas por letras minúsculas (a, b, c, d) através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Lima et al. (2004), avaliando a histopatologia dos linfonodos cervical superficial e poplíteo, em cães com LV, concluíram que os primeiros apresentavam-se mais acometidos. Considerando isso, nesse trabalho somente avaliamos as alterações histopatológicas dos linfonodos cervical superficial.

Os linfonodos cervicais superficiais de todos os animais infectados eram facilmente palpáveis; entretanto, em 18 animais (39,13%) a avaliação contralateral dos mesmos apontou o quadro de linfadenomegalia. Durante a necropsia, a superfície de corte dos mesmos apresentava-se lisa e brilhante e deixavam fluir líquido de coloração brancacenta (aspecto leitoso), sugerindo edema do tipo exsudato. Além disso, a camada cortical do órgão era notável e de fácil discernimento da camada medular, devido à presença de formações nodulares, de coloração branco-amarelada, sugerindo hiperplasia folicular. Esses nódulos, por sua vez, podiam ser confluentes originando áreas mais extensas.

7.9.1 – Microscopia

As alterações histopatológicas avaliadas nos linfonodos cervicais superficiais foram: espessamento da cápsula, em geral, associado à presença de infiltrado inflamatório crônico (linfadenite capsular); hipertrofia e hiperplasia da região cortical e paracortical, considerando a presença de folículos secundários (nódulos linfoides com centro germinativo); hipertrofia e hiperplasia das células dos cordões e seios medulares e consequentemente aumento dos mesmos. Os tipos celulares predominantes

eram: plasmócitos, macrófagos e seus derivados (células epitelióides e células gigantes) e linfócitos (linfoblastos). Outras alterações observadas foram congestão (vasos medulares); edema (presença de ultra-filtrado plasmático de aspecto amorfo, acelular e eosinofílico) geralmente nos cordões e seios medulares e não raro no espaço subcapsular e presença de pigmentos de hemossiderina (Figura 7).

Figura 7

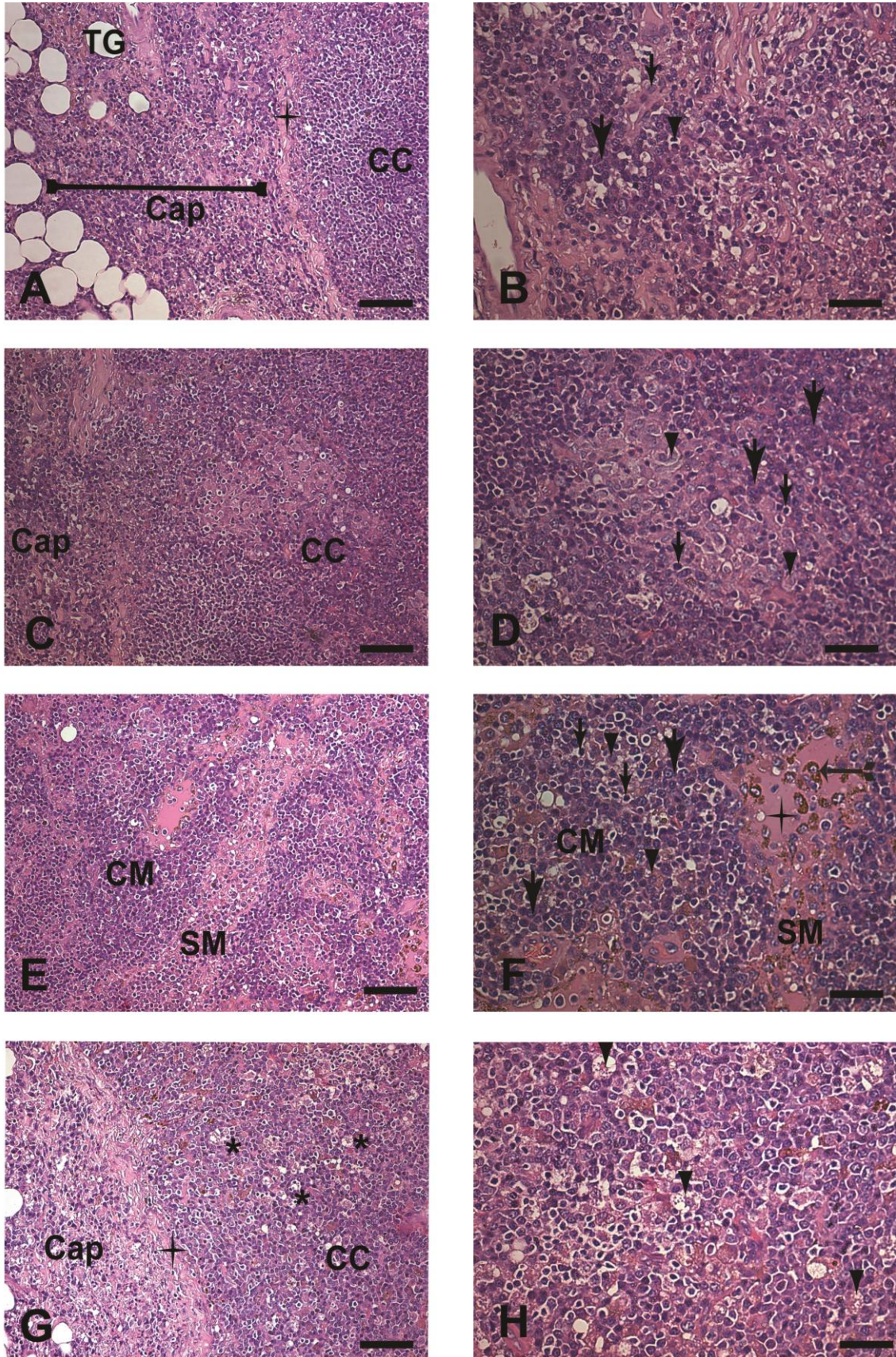


Figura 7: Fragmento de linfonodo cervical superficial de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Fotomicrografia panorâmica evidenciando cápsula espessada devido a processo inflamatório intenso (grande barra). Observar limitação de cápsula e camada cortical pelas fibras colágenas eosinofílicas (cruz fina). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 20x; Barra = 32µm). (B) Detalhe da figura anterior, na região da capsula, mostrando infiltrado inflamatório crônico composto por macrófagos de aspecto vacuolado contendo inúmeras formas de *Leishmania* (seta fina), plasmócitos (seta larga) e por linfócitos (cabeça de seta). Hemtatoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 40X; Barra: 16µm). (C) Observar cápsula inflamada (linfadenite capsular) e cortical sem formação de folículos linfoides. Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento de 20x; Barra: 32µm). (D) Detalhe da figura anterior mostrando a substituição de linfócitos (setas finas) por macrófagos parasitados (cabeças de seta) e grande número de plasmócitos (setas largas). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 400x; Barra: 16µm). (E) Observar hipertrofia e hiperplasia dos cordões e seios medulares Hemtatoxilina-Eosina (HE). (Aumento: 200x; Barra = 32µm). (F) Detalhe da figura anterior evidenciando cordões e seios com inúmeras células mononucleares sendo linfócitos (setas finas); macrófagos, por vezes parasitados (cabeças de seta), e grande número de plasmócitos (setas largas). Nos seios medulares nota-se a presença de edema (cruz fina) e macrófagos abarrotados de pigmentos de coloração castanha (flecha). Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 400x; Barra: 16µm). (G,H) Cortical evidenciando grande proliferação celular em aspecto de céu estrelado Hematoxilina-Eosina (HE). (Aumento 200x e Barra: 32 µm; Aumento 400x e 16 µm, respectivamente). Cap = Capsula; CC= Camada Cortical; CM= Cordões Medulares; SM= Seios Medulares; TG= Tecido Gorduroso.

Grupos Ant, LipV, Ant + Alo, LipV + Alo, Alo e C

Considerando a similaridade entre as manifestações histopatológicas observadas, entre os grupos, os resultados foram analisados conjuntamente.

Infiltrado inflamatório capsular e sub-capsular, predominantemente mononuclear (plasmohistiocitário), configurando o quadro de linfadenite capsular esteve presente em todos os grupos avaliados. Sua prevalência variou de 42,85% cães acometidos no grupo Ant a 83,33% de casos no grupo LipV. O grau de apresentação variou de discreto a intenso, com distribuição focal, multi-focal ou intensa. Por várias vezes, conjuntamente a esse quadro de linfadenite capsular foi possível identificar espessamento capsular, caracterizado pela deposição de tecido conjuntivo, regular, eosinofílico. O padrão de acometimento discreto a moderado prevaleceu, entretanto, em um cão do grupo controle esse se produziu de forma intensa. Quando avaliamos estatisticamente essas alterações, inflamação e espessamento capsular, não foi possível observar diferença entre os grupos avaliados (Gráfico 32).

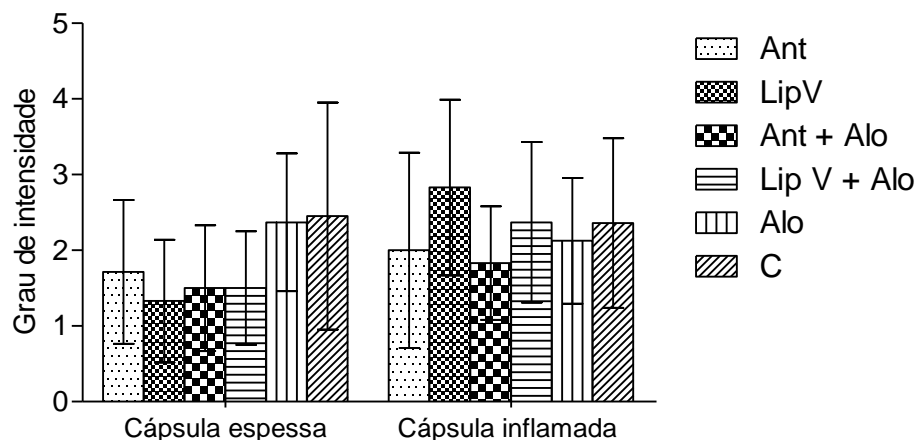


Gráfico 32: Grau de espessamento e inflamação da cápsula do linfonodo cervical superficial dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201.

Ant: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis

Outras alterações, encontradas na cápsula, merecem destaque como: a presença de células gigantes do tipo Langhans em três cães, sendo dois do grupo LipV e outro do grupo LipV + Alo. Assim como, a deposição sub-capsular de intensa quantidade de hemossiderina em um animal do grupo Ant + Alo.

Nos casos estudados, a hiperplasia da camada da cortical foi caracterizada pela presença de numerosos nódulos linfóides, porém sem a necessidade de formação de nódulos com centros germinativos. A hiperplasia da paracortical (camada entre a cortical e medular), por sua vez, foi considerada em conjunto com a hiperplasia da cortical, sendo esta caracterizada pelo aumento da celularidade (linfócitos) com expansão em direção à camada medular. Dessa forma, a hiperplasia e hipertrofia da camada cortical estiveram presentes em todos os grupos avaliados. O percentual de cães acometidos, por grupo, foi de pelo menos 50%, como observado no grupo

alopurinol (n=4). O padrão de acometimento variou de: discreto a moderado, no grupo Ant; moderado a intenso nos grupos Ant + Alo e LipV + Alo e discreto a intenso nos grupos LipV, Alo e controle (C).

Folículos linfóides reativos foram identificados, também, em todos os grupos estudados. Porém como descrito anteriormente, a hiperplasia da camada cortical não configurava sempre com a presença de folículos secundário, desta forma, em geral, esses ocorreram em menor intensidade. O padrão variou de discreto a moderado nos grupos LipV, Ant + Alo, LipV + Alo ou de discreto a intenso nos grupos Ant, Alo e controle (C). A avaliação das médias semi-quantitativas, referentes aos valores de hiperplasia cortical e reatividade dos folículos linfóides, não identificaram diferença entre os grupos (Gráfico 33).

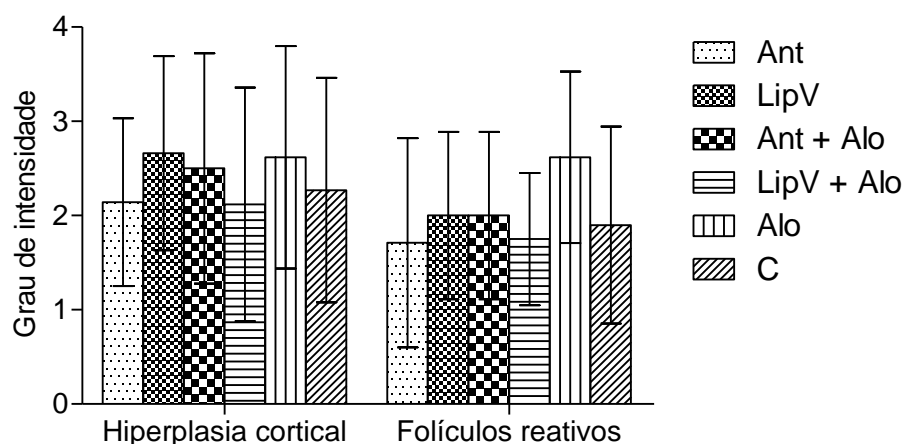


Gráfico 33: Grau de hiperplasia cortical e reatividade folicular do linfonodo cervical superficial dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. Ant: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

Somadas a essas alterações, em um cão do grupo LipV foi possível observar, áreas multifocais de macrófagos e células gigantes de Langhans contendo amastigotas de *Leishmania*. No grupo LipV + Alo, observou-se em um cão, na camada cortical, mais precisamente no folículo linfóide, a presença de células maiores e claras, que contrastam com as demais, propiciando em menor aumento o aspecto “em céu estrelado”. Estas células apresentavam citoplasma abundante contendo restos nucleares fagocitados, provenientes, provavelmente, de células que sofreram apoptose.

Hiperplasia e hipertrofia dos cordões medulares, foi evidenciada em todos os grupos, estando presente na maioria dos cães avaliados. O tipo celular presente variou, no geral, dentro do padrão mononuclear supracitado. O grau de intensidade foi de discreto a intenso, nos grupos Ant, Alo e C; moderado, no grupo Ant + Alo e moderado a intenso nos grupos LipV e LipV + Alo. Sendo importante ressaltar que, o grau de manifestação moderada a intensa, em muito dos casos se manifestava com presença de formações nodulares coalescentes, que praticamente obliteravam a luz do seio medular. Essas formações nodulares, por vezes, apresentavam folículos linfóides secundários.

Na maioria dos casos, houve correspondência entre a hiperplasia e hipertrofia das células que constituem os cordões medulares com o incremento da celularidade observada no seio medular. Entretanto, as avaliações das médias referentes à inflamação no seio medular assinalaram valores inferiores para os grupos Ant + Alo ($\bar{x} = 2,00 \pm 1,09$) e Alo ($\bar{x} = 2,00 \pm 1,19$) quando comparados ao grupo LipV ($\bar{x} = 3,33 \pm 1,21$) ($p < 0,033$) (Gráfico 34).

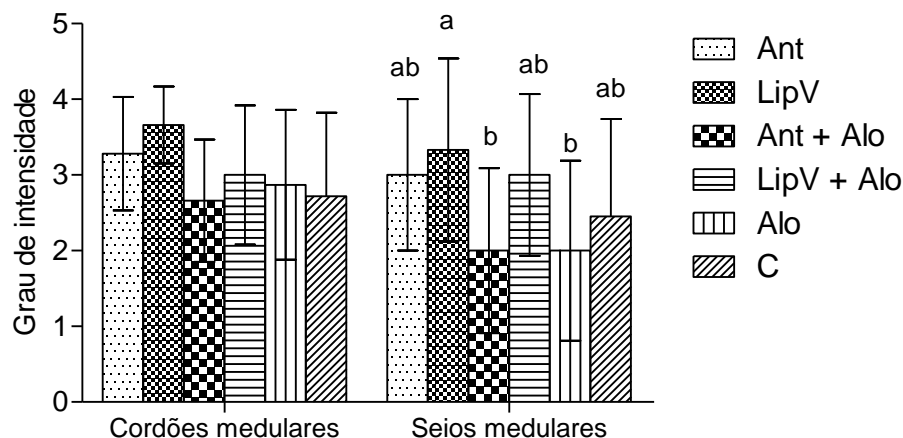


Gráfico 34: Grau de hiperplasia e hipertrofia das células dos cordões medulares e celularidade dos seios medulares do linfonodo cervical superficial dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201. Ant: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da intensidade da degeneração hidrópica no fígado: 1- ausência de infiltrado; 2- infiltrado discreto; 3 – infiltrado moderado; 4 – infiltrado intenso. Grupos marcados com letras minúsculas distintas (a e b) diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

Exsudação plasmática foi observada em cinco, quatro e cinco cães dos grupos LipV, LipV + Alo e controle (C), sendo que no último, observou-se associado a deposição de pigmento de hemossiderina.

Em um cão, do grupo Ant + Alo, não foram observadas quaisquer das alterações histopatológicas supracitadas.

7.9.2 – Avaliação da densidade parasitária no linfonodo cervical superficial

A avaliação da presença de formas amastigotas imuno-marcadas no linfonodo cervical superficial dos cães demonstrou que no grupo tratado com Ant + Alo e no tratado somente com Alo, um e dois cães se apresentaram positivos. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados (Gráfico 35).

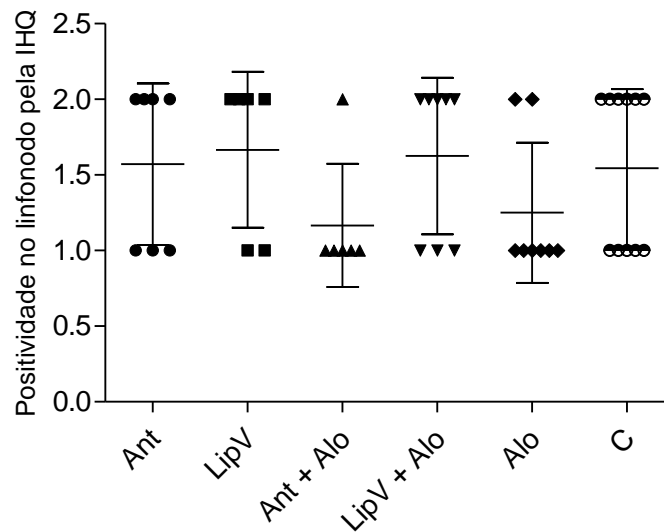


Gráfico 35: Determinação da presença de amastigotas imuno-marcadas no linfonodo cervical superficial de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a protocolo terapêutico no momento T201, pela técnica da estreptoavidina- peroxidase (IHQ). Ant: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico (n=7); LipV: lipossomas nanométrico vazios (n=6); Ant + Alo: antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométrico associados ao alopurinol (n=6); LipV + Alo: lipossomas vazios associados ao alopurinol (n=8); Alo: alopurinol (n=8) e C: controle (n=11). Critérios adotados para avaliação da positividade pela IHQ: 1- ausência de infiltrado; 2- presença de pelo menos uma amastigota de *L. chagasi*. Grupos não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de kruskal wallis.

8.0 DISCUSSÃO

Histórico e discussão sobre o protocolo terapêutico preconizado

A presença ou a ausência de animais, como reservatórios para o parasito *Leishmania*, no contexto da leishmaniose visceral (LV), conduzem a duas possibilidades quanto aos ciclos epidemiológicos que podem ser nominados de: zoonótico (LVZ) e antroponótico (LVA), respectivamente (Palatnik-de-Souza et al., 2001).

Quando se considera o ciclo da LVA, o homem, por apresentar intenso parasitismo no sangue e tegumento, associado ao caráter antropofílico do vetor, torna-se o próprio reservatório da doença. Esse tipo de afecção, que possui como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania do complexo Leishmania donovani*, está presente na Índia, Bangladesh, Nepal, Bihar além de países da região leste do Continente Africano como Quênia, Sudão, Uganda e Etiópia (Palatnik-de-Souza e Day, 2011). Por outro lado, a LVZ, que ocorre em países da Bacia do Mediterrâneo, Ásia, Norte da África e América do Sul, apresenta o cão doméstico, *Canis Lupus familiaris*, como reservatório para a doença humana. Postula-se que, para a manutenção do ciclo epidemiológico da LVZ, a participação do homem seja irrelevante, entretanto, pesquisas recentes questionam seu verdadeiro papel epidemiológico. De fato, Fichoux et al. (1999) avaliando o sangue de doadores, em área endêmica da França, verificaram a ocorrência de parasitemia em pacientes assintomáticos portadores de LV. Somado a isso, Molina et al. (1999) avaliaram, através da

técnica do xenodiagnóstico, a infectividade de fêmeas de *Phlebotomus perniciosus* em pacientes portadores de LV co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana. Os resultados revelaram que todos os pacientes apresentaram capacidade infectante, durante o repasto sanguíneo.

Para o controle da LVZ, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda como estratégia de controle o seguinte: (1) tratamento adequado dos casos humanos; (2) inquérito sorológico dos cães; (3) eutanásia dos cães soropositivos e (4) controle do vetor através do uso de inseticidas de ação residual (Tesh, 1995).

Segundo Ribeiro et al. (1999), a doença canina, do ponto de vista epidemiológico, é considerada mais importante que a doença humana, pois além de ser mais prevalente, os animais infectados apresentam elevado parasitismo cutâneo, tornando-os a principal fonte de infecção para o inseto vetor. Seguindo esse raciocínio, o Ministério da Saúde (2004) relata que a proporção de casos de humanos infectados comparada aos casos caninos, nos diferentes focos, é muito variável, embora a enzootia canina tenha sempre precedido a infecção no homem apresentando prevalência mais elevada. Entretanto, o processo de expansão geográfica e urbanização da LV têm levado à necessidade de se estabelecer medidas mais eficazes de controle (Alves e Bevilacqua, 2004; Palatnik et al., 2011).

Contudo, apesar da recomendação da OMS sobre a eutanásia dos cães portadores da infecção ser preconizada, esta é pouco aceita por questões éticas, emocionais e econômicas. Além disso, estudos realizados em países onde a eutanásia é adotada como medida de controle mostram resultados

pouco satisfatórios (Palatinik-de-Sousa et al., 2001; Ashford et al., 1998). Braga et al. (1998) citam a participação de mais de dois milhões de cães em triagem sorológica, culminando em 160.000 eutanásias, as quais não tiveram efeito sobre a redução da incidência da LV humana a níveis aceitáveis. Essa prática, portanto, conduz à diminuição da transmissão da LV na área de cobertura com duração apenas de médio prazo, sendo que algum tempo após sua interrupção, a incidência e a prevalência da infecção voltam a atingir os antigos níveis (Moreno et al., 2002). Entretanto, sabe-se que o controle da LVZ é realizado com diferentes estratégias em diferentes países. Sendo que, quando consideramos a realidade dos países das Américas, o controle dessa afecção tem se mostrado um desafio.

Os complexos organoantimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), no qual estão incluídos o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, constituem a primeira linha de medicamentos utilizados no tratamento de todas as formas de leishmanioses, apresentando, no homem, elevada taxa de cura (Marsden, 1985). Entretanto, sua administração em cães com LV é controversa, uma vez que, somada às desvantagens relacionadas à elevada toxicidade (Fusai et al., 1995), existe um rápido *clearance* renal com presença de 80% da droga livre na urina, nas primeiras 6h após a administração por via endovenosa (Tassi et al., 1994); associado a rápida redução das concentrações plasmáticas a níveis inferiores aos considerados inibitórios (Valladares et al., 1996) e meia vida plasmática de apenas 10h (Schettini et al., 2006). Somado a isso, existe a necessidade de administrações periódicas, uma vez que, recidivas nos cães com LV são comuns (Slappendel e Teske, 1997) o que pode induzir ao surgimento de cepas de *Leishmania* resistentes (Carrió e Pórtus, 2002).

Considerando isso, uma alternativa eficaz no tratamento da LV, tanto para o homem quanto para o cão, consiste na utilização de quimioterápicos anti-*Leishmania* empregando sistemas carreadores coloidais. Uma vez que, os grandes laboratórios farmacêuticos investem pouco no desenvolvimento de novas moléculas ativas. Desta forma, esses sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos constituem alternativa para incremento da eficácia farmacológica.

Pesquisadores, pertencentes a diferentes unidades da UFMG, compõem o Grupo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos Leishmanicidas. Este grupo atua na promoção do estudo de novos medicamentos e novas formulações para os medicamentos contra as leishmanioses, em diferentes modelos experimentais, desde o ano de 1999. Assim, Demicheli et al. (1999) sintetizaram o antimoniato de meglumina através de dois processos diferentes: a partir de $SbCl_5$ ou a partir do $KSb(OH)_6$. Enquanto, Frézard et al. (2000) realizaram seu encapsulamento, em lipossomas convencionais, usando novos métodos mais simples e eficientes. Após avaliação em hamsters infectados por *L. chagasi*, a preparação administrada em dose única induziu o decréscimo médio de até 50 vezes da carga parasitária no baço e fígado dos animais (Frézard et al., 2000). Schettini et al. (2003) avaliaram a biodistribuição de 3,8 mg/Kg de antimônio (Sb^{+5}) encapsulado em lipossomas (LMA) de 2,37 μ m de diâmetro hidrodinâmico, em cães saudáveis, 3, 48 e 96h e sete dias após a administração única, por via endovenosa. Os dados mostraram que as maiores concentrações de Sb^{+5} , na medula óssea, ocorreram 3h após a administração do LMA, ao passo que, no fígado e baço isso foi demonstrado 48h após a administração. Posteriormente, Schettini et al. (2005) avaliaram a

farmacocinética da LMA em cães com LV. Para isso, os animais receberam 6,5mg Sb/Kg em lipossomas de 1,2µm de diâmetro hidrodinâmico ou receberam lipossomas nominados “vazios”, em quatro doses a cada quatro dias, por via endovenosa. O terceiro grupo permaneceu como controle positivo. Os níveis farmacocinéticos do Sb⁺⁵ foram determinados em aspirados de medula óssea dos cães tratados, sendo observado um aumento significativo das concentrações partindo de 0,76µg/g do órgão, quatro dias após a primeira administração, para 2,07µg/g quatro dias após a quarta dose. Apesar do incremento da concentração de Sb na medula óssea significar um dado animador, quando comparado aos resultados anteriores, houve falha na eliminação da *Leishmania* da medula óssea. Os autores concluíram que essa falha pode ser decorrente da utilização de lipossomas de diâmetro superior a 1µm, os quais possuem uma biodisponibilidade limitada sobre a medula óssea.

Esforços, na tentativa de se reduzir o diâmetro hidrodinâmico desse carreador coloidal, foram realizadas. Deste modo, foi feita modificação do método de desidratação-reidratação, fundamentado na utilização de um açúcar como agente criopreservante, o qual permitiu a obtenção de lipossomas mais homogêneos e de diâmetro hidrodinâmico reduzido, em torno de 410nm (Schettini et al., 2006). Esses autores avaliaram a farmacocinética na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Os resultados indicaram biodisponibilidade até três vezes superior, junto à medula-óssea, quando comparada aquela fornecida pela formulação de antimoniato de meglumina em lipossomas de diâmetros micrométricos, desenvolvida por Schettini et al., (2005).

A avaliação de aspectos histopatológicos e imunológicos de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (Schettini et al., 2006) foram realizados por Moura (2007). O protocolo terapêutico consistiu na administração de doses de 6,5 mg de Sb⁺⁵/kg, pela via endovenosa, em quatro aplicações com intervalos de 96 h. Os resultados indicaram redução da carga parasitária no baço, fígado e linfonodos, contrariamente aos resultados observados na medula óssea e pele.

Desta forma, considerando a evolução dos Medicamentos Leishmanicidas, desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa da UFMG (Demicheli et al., 1999; Frézard et al., 2000; Schettini et al., 2003; Costa Val, 2004; Schettini et al., 2005; Schettini et al., 2006; Moura, 2007; Ribeiro et al., 2008), o atual trabalho propõe a utilização de lipossomas de diâmetro hidrodinâmicos de 350 ± 58 nm com um índice de polidispersão de 0.30 ± 0.07 , em dose correspondente a 6,5mg/Kg p.v., a cada 96h, em um total de seis aplicações.

A velocidade de liberação do princípio ativo pode ser controlada pela manipulação tanto da composição da membrana (influenciando a velocidade de degradação dos lipossomas), quanto do tamanho dos lipossomas (influenciando a eficiência de captura pelos macrófagos). Portanto, lipossomas pequenos permanecem por mais tempo na circulação sanguínea, garantido uma liberação mais prolongada do fármaco, em relação aos lipossomas de maior diâmetro. Associado a isso, torna-se importante a investigação da associação desse quimioterápico com o alopurinol no tratamento de cães com LV. Uma vez que, a literatura internacional aponta para protocolos terapêuticos que utilizem associações de drogas leishmanicidas e leishmanioestáticas na

rápida remissão dos sinais clínicos e cura da LVC (Baneth e Shaw, 2002; Noli e Auxilia, 2005).

Influência do tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de tamanho nanométricos na expressão de CD11b/CD18, MHCII e TLR-2 em monócitos CD14⁺

O sistema imune do hospedeiro apresenta papel central no estabelecimento da infecção e na avaliação do êxito de um protocolo terapêutico (Pinelli et al., 1994).

As Leishmanias são parasitos intracelulares obrigatórios que residem quase exclusivamente dentro de células mononucleares fagocitárias de seus hospedeiros vertebrados (Chang, 1983). Vários componentes da resposta inata participam de mecanismos de defesa contra protozoários, mas, embora as promastigotas de *Leishmania* sejam sensíveis ao complemento, *in vitro*, as formas infectantes resistem à sua ação. O processo de internalização das formas metacíclicas infectantes pode ser mediado por receptores presentes na superfície de células do SMF, entre os quais, os receptores da porção Fc (Woelbing et al., 2006), receptores de manose fucose (Blackwell et al., 1985), receptores TLR-2 e TLR-3 (Flandin et al., 2006) e receptores do complemento do tipo 3 (CD11b/CD18 ou CR3) (Mosser e Edelson, 1985).

Pesquisas anteriores, desenvolvidas por Moura (2007), avaliaram imunologicamente o tratamento de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* (protocolo semelhante, porém sem a pesquisa do efeito do alopurinol). A expressão de CD11b/CD18 na população de monócitos, avaliada pela técnica de citometria de fluxo, não apresentou diferença estatística 30 e 60 dias

após o início do tratamento, para qualquer dos grupos experimentais, apesar dos valores observados em T60 serem inferiores aqueles verificados em T30.

Em nosso experimento, a avaliação da expressão da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD11b/CD18 (CR3), na população de monócitos CD14⁺, apresentou aumento significativo da expressão do receptor CR3 no grupo Ant, de T0 ($\bar{X} = 11,93 \pm 4,16$) ($\bar{X} = 11,93 \pm 4,16$) quando comparado a T140 ($\bar{X} = 24,88 \pm 3,28$; $p < 0,0001$). Quando comparado aos outros grupos experimentais, somente esse grupo apresentou essa tendência crescente de expressão de CR3 ao longo dos tempos T0, T60 e T140. De fato, a análise dos grupos tratados com alopurinol, sozinho, ou em associação não revelou diferença estatística ao longo dos tempos T0 a T140. Esses grupos que utilizaram o alopurinol apresentaram cinéticas semelhantes entre si, o que talvez mostre algum efeito na resposta imune envolvendo a expressão de CR3. O CR3 é descrito como um receptor capaz de potencializar a internalização e sobrevivência de formas amastigotas de *Leishmania* opsonizadas com a fração C3bi do complemento (Mosser e Edelson, 1985). Carter et al. (2009), trabalhando com camundongos experimentalmente infectados com *L. major*, verificaram que camundongos BALB/c CD11b-deficientes apresentaram lesões intermediárias, quando comparadas às apresentadas pelos camundongos BALB/c selvagens e os camundongos C57BL/6, os quais desenvolveram progressiva e localizada lesão, respectivamente. Gonçalves et al. (2005) e Sampaio et al. (2007) descreveram a importância, *in vitro*, de CR3 na interação de monócitos circulantes caninos com *L. chagasi*. De Amorim et al. (2011), em estudos *in vivo*, verificaram que os cães naturalmente infectados com *L. chagasi* com resultado de IHQ e xenodiagnóstico negativos

apresentaram, em monócitos CD14⁺ do sangue periférico, maior IMF de CD11b/CD18 e MHCII quando comparados aos valores observados em cães que apresentaram-se positivos nos dois exames parasitológicos. Os autores discutem a participação dos monócitos circulantes como células efetoras na LVC.

Quando correlacionamos os dados de CD11b/CD18 aos resultados encontrados na avaliação do parasitismo da pele, pela técnica da IHQ, nos tempos T0, T60, T140 e T201, observou-se que aqueles grupos que apresentaram todos os cães negativos pela IHQ, em algum momento da avaliação, foram aqueles que apresentaram níveis constantes de CD11b/CD18 ao longo do tempo. Corroborando essa hipótese, podemos ressaltar que no caso do grupo tratado com associação de Ant + Alo não houve modificações significativas da expressão de CD11b/CD18, mesmo quando consideramos o último momento de avaliação (T200), sendo o único grupo que manteve níveis constantes ao longo de todas as avaliações. Portanto, a efetiva eliminação de parasitos pode se tornar possível a partir do momento em que monócitos CD14⁺ expressem de forma contínua e progressiva a integrina CD11b/CD18 (CR3).

Os chamados lipossomas convencionais, utilizados em nosso estudo, formados de fosfatidilcolina ou de surfactantes não iônicos e de colesterol, quando administrados por via endovenosa, sofrem o processo de opsonização que ocorre logo após seu contato com componentes do sangue. Esse processo facilita a posterior captura por células do SMF principalmente do fígado, baço e da medula óssea. Após a fagocitose, os lipossomas sofrem degradação pelas fosfolipases lisossomais, favorecendo a liberação do fármaco encapsulado

para o citosol ou liberação desse para o meio extracelular (Schettini et al., 2005). Conjuntamente, os lipossomas, que também podem ser usados como adjuvantes imunológicos, são hábeis em estimular a resposta mediada por células, uma vez que após sua degradação, podem se combinar com moléculas MHCII (Frézard, 1999). Moura (2007), entretanto, não encontrou diferença significativa na expressão de MHC classe II, na população de monócitos do sangue periférico, entre os grupos Ant, LipV e C, nos tempos 30 e 60 dias após o início do tratamento. Alexandre-Pires et al. (2010) também avaliaram o perfil imunofenotípico de leucócitos do sangue periférico de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, sintomáticos e assintomáticos; cães saudáveis não infectados e cães naturalmente infectados submetidos a protocolo terapêutico de 100-200mg/Kg de antimoniato de meglumina, via subcutânea ou intramuscular, por 20 dias associado ao alopurinol (10mg/Kg, *per os*). Esses autores verificaram que a avaliação da frequência de MHCII, na população de monócitos do sangue periférico, não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais. De forma semelhante, em nosso trabalho, não encontramos incremento na expressão da molécula de MHCII, dentro de cada grupo ao longo de T0 a T200. Apesar de verificarmos uma oscilação de sua expressão, em nenhum dos momentos, após o início do tratamento, esses valores referente a IMF de MHCII se apresentaram superiores aqueles conferidos em T0.

O lipofosfoglicano (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., 2006, Kavossi et al., 2010). Dessa forma, com a finalidade de pesquisar o papel do TLR-2 e TLR-3 no curso da infecção com *L. major*, Kavossi et al. (2010) avaliaram a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos *in vitro* após estímulo com LPG, na presença e ausência de anticorpos anti-TLR-2 e TLR-3. Os resultados indicaram que o LPG era capaz de induzir a produção de NO via TLR-2, uma vez que na presença de anticorpos específicos anti-TLR-2 essa produção foi reduzida a níveis semelhantes ao do grupo controle. Contrariamente, o grupo tratado com anticorpos anti-TLR-3 não apresentou modificação quanto à produção de NO. Os autores concluem que TLR-2 apresenta importante papel no curso da doença por promover ativação do fator de transcrição NF- κ B e indução final de NO.

Nossos resultados demonstraram que o perfil desenvolvido do período T0 a T140 apresentou cinética semelhante quando consideramos o grupo Ant e o grupo LipV + Alo, os quais apresentaram um incremento significativo da expressão de TLR-2 no momento T140, quando comparado a T0 e T60. Esse perfil semelhante, quanto à expressão de TLR-2 na superfície dos monócitos CD14⁺, não prediz o possível perfil parasitológico dos cães, pois o grupo Ant em nenhum dos momentos avaliados apresentou negatividade para a IHQ, ao passo que o grupo LipV + Alo apresentou em dois momentos (T60 e T140) resultados negativos para IHQ. Quando consideramos essa análise, a avaliação do grupo Ant + Alo se torna necessária, pois esse apresentou IHQ negativa em T60, positividade em T140, em apenas um cão, e novamente negatividade em T201 para todos os animais. Comparando esses dados, com a cinética de TLR-2, esse grupo apresentou um decréscimo significativo da

média de IMF, em T60, quando comparada à média em T0, com posterior restabelecimento em T140, sem diferença estatística entre os momentos T0 e T140. Quando comparamos as médias de T0 e T200 houve uma redução significativa da expressão de TLR-2 em T200, sendo esse o único grupo que apresentou diferença estatística entre o primeiro e o último momento de avaliação. Portanto, podemos dizer que o tratamento é capaz de modular o receptor TLR-2, uma vez que, principalmente nos grupos Ant e LipV + Alo observamos modificações, estatisticamente significativas, quanto a cinética de apresentação desse receptor. Além disso, a redução da IMF de TLR-2 pode indicar provável envolvimento no sítio de ligação do parasito no momento da endocitose, estando esse localizado no fagossomo intracelular.

Influência do tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de tamanho nanométricos nas subclasses de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, no sangue periférico

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 é extremamente efetiva no mecanismo de defesa contra agentes intracelulares como 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 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 significativa redução da percentagem de linfócitos T CD4⁺, no sangue periférico, quando comparado aos níveis verificados para os cães normais (Bourdoiseau et al., 1997; Alvar et al. 2004). Alvar et al. (2004) relatam que a diminuição da população de linfócitos T CD4⁺ está diretamente relacionada a progressão da doença e infectividade junto a *Lu. Longipalpis*, uma vez que, existe uma real incapacidade do hospedeiro em controlar a disseminação do parasito.

A avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico demonstrou que houve correlação direta entre a melhora clínica e os níveis séricos de linfócitos T CD4⁺ (Alvar et al., 2004). Entretanto, Moura et al. (2007) utilizando protocolo terapêutico semelhante ao utilizado em nosso projeto, como já descrito, expôs que a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ encontrados no grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos não diferiram dos valores obtidos no grupo controle. Nossos resultados corroboram os achados de Moura (2007), uma vez que, quando consideramos a frequência da população de linfócitos T CD4⁺ não houve diferença dentro de um mesmo grupo experimental ao longo do tempo de experimento, assim como, em um mesmo período considerando todos os grupos experimentais conjuntamente. E contrariamente aos dados obtidos por Alvar et al. (2004), não houve correspondência entre a positividade pela IHQ, em biópsias de pele obtidas ao longo do experimento, e a evolução dos sinais clínicos dos cães junto ao percentual de linfócitos TCD4⁺. Em detalhe podemos descrever que o grupo

controle que apresentou progressão da frequência de sinais clínicos, assim como positividade pela IHQ em todos os momentos de avaliação de T0 a T201, não apresentaram oscilação no percentual de linfócitos T CD4⁺. Considerando esse mesmo raciocínio, o grupo Ant + Alo que apresentou progressiva remissão dos sinais clínicos, conjuntamente a negatividade pela IHQ na pele, baço e fígado, também não apresentou modulação da população de linfócitos TCD4⁺. Dessa forma, podemos concluir que o tratamento não foi capaz de modular a resposta celular do tipo CD4, entretanto, essa não influenciou a resolução dos sinais clínicos e parasitológicos nos cães do grupo Ant + Alo.

Perfil semelhante foi observado para o percentual de linfócitos T CD8⁺, uma vez que não houve diferença entre a frequência da população dentro de um mesmo grupo, ao longo dos momentos de avaliação, e tampouco entre os grupos em um único momento. Esses resultados são discordantes dos observados por Moura (2007), a qual observou uma diminuição do número de linfócitos T CD8⁺, tanto no grupo LipV quanto no grupo controle, e uma manutenção do percentual de CD8⁺, no grupo antimônio lipossomal, ao longo dos momentos de avaliação. Esses autores concluíram que o tratamento foi capaz de modular a resposta imune mantendo o nível de linfócitos T CD8⁺ no sangue circulante. Ribeiro (2007), também avaliando esses mesmos cães observou que no momento correspondente a 30 dias após o início do tratamento houve uma melhora clínica dos cães pertencentes ao grupo antimonial, entretanto, em nova avaliação (T90), houve uma piora clínica dos mesmos. Quando comparamos os dois trabalhos, podemos conjecturar que mesmo o percentual de linfócitos T CD8⁺ terem se mantido constantes, nos dois momentos de avaliação, não houve correspondência quanto à estabilidade

clínica. Retomando os dados referentes ao percentual de CD8 verificamos o mesmo raciocínio descrito para os linfócitos T CD4⁺, uma vez que, os valores séricos obtidos não influenciaram os achados clínicos e parasitológicos evidenciados pela IHQ. Continuando esse pensamento, nossos resultados discordam daqueles obtidos por Reis et al. (2009). Esses autores, após avaliação das características imunofenotípicas dos leucócitos circulantes, através da técnica de citometria de fluxo, em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* concluíram que os níveis séricos de linfócitos T CD8⁺, poderiam ser considerados como biomarcadores do perfil assintomáticos da LVC.

Em nosso experimento, a avaliação da IMF de CD4 na população de linfócitos T demonstra uma oscilação da expressão, ao longo das avaliações, em todos os grupos avaliados. Sendo que, o grupo Ant + Alo foi o único que apresentou os valores obtidos em T200 semelhantes aqueles observados em T140 e T0. As moléculas CD4 e CD8 são proteínas das células T que se ligam às regiões não polimórficas das moléculas de MHC e transduzem os sinais que, juntamente com os sinais liberados pelo complexo TCR, iniciam a ativação das células T (Teva, 2010). Desta forma, os valores mais constantes relativos à intensidade ou densidade de expressão do marcador CD4, observado no grupo Ant + Alo, pode indicar que esse tratamento foi capaz de modular a expressão desse co-receptor. Entretanto, a avaliação da IMF de CD8 não indica esse perfil, pois os grupos LipV, Ant + Alo e controle (C) apresentaram cinética semelhante de expressão, sem diferença estatística entre os tempos avaliados.

CLÍNICA e TEGUMENTO

Os sinais clínicos sugestivos de LVC, 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 da doença patente (Ciaramella et al., 1997). Essa diversidade pode ser consequência de interações complexas entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (Santos-Gomes et al., 2002). Diante desta gama de apresentações clínicas, Manciante et al. (1988) propuseram que os cães com LV fossem classificados em: assintomáticos, quando da ausência de sinais clínicos; oligossintomáticos, aqueles com linfadenopatia, perda de peso e/ou pelo opaco e em sintomáticos, aqueles cães que apresentassem vários sinais clínicos como alterações cutâneas, onicogribose, emagrecimento e comprometimento oftálmico. Nosso critério de classificação clínica, entretanto, considera que o cão deva ser nominado como sintomático quando apresentar pelo menos um sinal clínico sugestivo de LV (de Amorim et al., 2010), apoiado em critérios anteriores de inclusão tais como: sorologia e parasitologia positivos. Dessa forma, todos os cães avaliados foram inicialmente classificados como sintomáticos (Amorim et al., 2011). Visto que a condição clínica é importante na determinação da resposta ao tratamento (Ribeiro, 2007), a participação igualitária das diferentes manifestações clínicas presentes nos cães antes do início do tratamento possibilitou que as formulações terapêuticas atuassem sobre o mesmo universo de apresentações clínicas, sendo essa a realidade observada na clínica veterinária.

Ribeiro (2008) utilizando protocolo de antimonial veiculado em sistema de transporte, semelhante ao utilizado nesse trabalho, observou que o grupo

tratado apresentou melhora clínica principalmente 30 dias após o início do tratamento, entretanto, verificou progressiva piora até os 150 dias. Nossos resultados também demonstram relativa melhora dos sinais clínicos, em geral, até os 170 dias após o início do tratamento. Entretanto, os sinais clínicos avaliados apresentaram uma remissão mais notável naqueles grupos que utilizaram o alopurinol sozinho ou em associação. Nesse contexto, merece destaque o grupo Ant + Alo que apresentaram remissão da maior parte dos sinais clínicos, inicialmente evidenciados em T0, até o momento T140.

No contexto dos sinais clínicos sugestivos de LVC, o tegumento dos cães representa grande importância no ciclo epidemiológico da LV, uma vez que, além de ser um dos órgãos mais acometidos clinicamente no curso da doença (Ferrer, 1989; Xavier, 2006; Sarodomichelakis et al., 2007), 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* (Sarodomichelakis et al., 2007). Na verdade, apesar da reconhecida natureza viscerotrópica do protozoário, a importância da pele como fonte de infecção para o inseto vetor vem sendo descrita há muito tempo. No Brasil, Deane (1956) relatou a presença de formas amastigotas na pele de 77,6% dos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* no Estado do Ceará.

Segundo Ferrer (1989), a sintomatologia cutânea apresentada pelo cão é diferente daquela manifestada no homem acometido por LV; sendo que, no último, existe uma inflamação local e as alterações histopatológicas permanecem restritas à região acometida. Ao passo que no cão, a pele é afetada durante a progressão da doença para os órgãos internos.

Ferrer et al. (1988) propuseram quatro padrões dermatológicos para a LVC: padrão alopecico-descamativo; ulcerativo; nodular e pustular estéril. Os outros sinais cutâneos frequentemente encontrados são hiperkeratose nasodigital e onicogribose (Koutinas et al., 1993). Saridomichelakis et al. (2007) em estudo avaliando a densidade parasitária na pele de diferentes regiões do corpo de cães com LV, sintomáticos, verificaram que os sinais dermatológicos presentes foram dermatite esfoliativa, hiperkeratose, onicogribose e ulceração. De forma semelhante, Koutinas et al. (2010) ao avaliarem o quadro histopatológico desenvolvido no leito ungueal de 40 cães naturalmente infectados com *L. chagasi* citam que as alterações dermatológicas mais frequentes, além da onicogribose, foram: dermatite esfoliativa, seguida de ulceração e hiperkeratose. Os principais sinais dermatológicos evidenciados, nesse estudo, foram: seborreia seca com escamas do tipo micáceas e/ ou furfuráceas, de cor branca a prateada (n=35; 76%), hiperkeratose (n=26; 56,52%), alopecia (n=20; 43,47%), dermatite esfoliativa (n=20; 43,7%), hipotricose (n=18; 39,13%), ulcera (n=16; 34,78%), onicogribose (n=16; 34,78%), seborreia úmida (n=9; 19,56%), vasculite de ponta de orelha (n=8; 17,39%), vasculite de ponta de cauda (n=1; 2,17%) e hiper-pigmentação (n=1; 2,17%). Dessa forma, as frequências referentes às alterações dermatológicas estão de acordo com os autores anteriores, uma vez que os sinais descritos por eles configuram entre as cinco principais alterações observadas em nosso estudo. Sob a ótica da classificação de Ferrer et al. (1988), o padrão nodular e pustular estéril não foram observados durante as avaliações sequenciais.

Avaliando o perfil exsudativo das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com LV, Neto et al. (2008) observaram que essas se

caracterizavam por um infiltrado inflamatório constituído por macrófagos epitelióides, poucos linfócitos e variável número de plasmócitos. De forma semelhante, Figueiredo e colaboradores (2010) analisando a histopatologia e a parasitologia da pele de orelha de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte, observaram que a dermatite crônica foi observada em 51 dos 55 cães (92,7%), caracterizada por um infiltrado celular no interstício composto principalmente por células mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos). Em geral, o exsudato celular era difuso na derme superficial e focal ao redor de vasos, glândulas e folículos pilosos na derme profunda. Em nosso experimento, de forma equivalente, observamos que antes do início do tratamento (T0) a pele de cada um dos cães apresentou elevado percentual de inflamação (dermatite crônica), sendo que, esse esteve presente em 40 dos 46 cães (86,95%) avaliados. De forma detalhada, 23 dos 40 cães apresentaram perfil discreto (57,5%), onze perfil moderado (27,5%) e seis perfil intenso (15%) de acometimento, com padrão de distribuição difuso (n=31), localizado predominantemente na derme profunda (n=37) e composto principalmente pelo tipo celular plasmohistiolinfocitário (n=30). De forma simultânea, os outros achados histopatológicos verificados antes do início do tratamento foram: hiperkeratose/ ortokeratose (n=31; 67,39%), degeneração hidrópica epitelial (n=23; 50%), acantose (n=9; 19,56%), plasmocitose (n=9; 19,56%), espongirose (n=7; 15,21%), papilomatose (n=3; 6,25%), necrose (n=1; 2,17%) e presença de células gigantes (n=1; 2,17%). A frequência desses sinais, em cães com LV, são confirmados pelos autores Solano-Gallego et al. (2009) que citam a hiperkeratose/ ortokeratose, acantose e ulceração e por Figueiredo et al.

(2010) que acrescentam a paraceratose, papilomatose, espongiose e degeneração epidérmica como as principais alterações histopatológicas da epiderme.

Quando consideramos a evolução dos sinais clínicos dermatológicos, ao longo do protocolo terapêutico, dentro de cada grupo experimental, pudemos constatar melhora significativa nos cães tratados com LipV + Alo, Ant + Alo e Alo. É importante ressaltar que, desses grupos citados, o Ant + Alo apresentou acentuada melhora em todos os sinais evidenciados em T0, sendo que, quando consideramos o último momento de avaliação (T201), apenas dois dos sinais inicialmente presentes foram observados – hiperkeratose e alopecia – com diminuição expressiva de sua frequência quando comparada aquela observada antes do início do tratamento. De forma semelhante, os cães tratados com Ant + Alo e Alo apresentaram significativa redução do infiltrado inflamatório em T201 quando comparado a T0. Redução significativa das alterações histopatológicas, ao longo do tratamento, também foram observadas nos grupos LipV + Alo e Alo. Sendo que, o grupo LipV + Alo apresentou melhora do quadro de degeneração hidrópica epitelial, no período de T0 a T140 e o grupo Alo apresentou melhora do quadro de degeneração, hiperkeratose e espongiose de T0 a T201.

Noli e Auxilia (2005) em revisão de literatura sobre o tratamento de cães com LV, considerando a utilização concomitante de antimoniato de meglumina (via sub-cutânea, intra-muscular ou endovenosa) e alopurinol (via oral); consideraram que a melhora clínica expressiva observada nos cães provavelmente foi decorrente da ação do antimoniato de meglumina, uma vez que, os resultados obtidos nos grupos tratados somente com antimoniato foram

similares aqueles obtidos pela associação quimioterápica. Nossos resultados não estão de acordo com essa proposição, pois os cães que foram tratados com alopurinol ou com associação apresentaram melhora tanto dos sinais clínicos gerais, quanto das alterações dermatológicas e histológicas, assim como, redução do infiltrado inflamatório e da positividade na IHQ, quando comparados aos outros cães. Entretanto, considerando particularmente o grupo tratado com antimoniato, é importante ressaltarmos que os trabalhos descritos pelos autores Noli e Auxilia (2005) utilizaram uma dosagem de 100mg Sb/Kg, por dia, por pelo menos três semanas, ao passo que em nosso experimento utilizamos uma dose de 6,5mg/Kg, a cada quatro dias, totalizando seis aplicações. Assim, mesmo considerando que os antimoniais pentavalentes encapsulados em lipossomas são mais eficazes do que a forma livre talvez seja necessário reavaliar o protocolo terapêutico administrado. Essa idéia é reforçada pela comparação aos achados de Moura (2007), que não utilizaram a associação com o alopurinol e que estão de acordo como os nossos resultados. A autora descreve que a intensidade das manifestações histopatológicas observadas no tegumento dos cães analisados, assim como o grau de parasitismo, não sofreram influência do tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos.

Atualmente, a farmacoterapia que utiliza a combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol é considerada a mais eficaz no tratamento de cães com LV (Denerolle e Bourdoiseau, 1999; Baneth e Shaw, 2002; Noli e Auxilia, 2005; Torres et al., 2011). Essa indicação procede, uma vez que os cães pertencentes ao grupo Ant + Alo apresentaram remissão da maior parte dos

sinais clínicos inicialmente identificados, assim como resultado negativo para IHQ em dois momentos de avaliação.

FÍGADO, BAÇO e LINFONODO

FÍGADO

De acordo com Koutinas et al. (2001) os objetivos propostos pelos tratamentos são múltiplos, variando desde a melhora clínica dos animais sintomáticos até a própria prevenção do aparecimento desses sinais clínicos, naqueles cães assintomáticos, sendo que o intuito em comum é a cura parasitológica, a qual evita, por si só, futuras recidivas. Na LV humana, ocorre o desenvolvimento de uma resposta imune órgão-específica em dois principais órgãos alvos da infecção: o baço e o fígado (Stanley e Engweda, 2007), sendo descrita, de forma semelhante, no estudo do cão com LV (Lima et al., 2007; Reis et al., 2009).

Segundo Keenan et al. (1984) e Tafuri et al. (2001) as lesões anatomopatológicas observadas em cães infectados com *Leishmania* são semelhantes em muitos aspectos, para aquelas descritas na leishmaniose visceral humana. Keenan et al. (1984) constataram que, as lesões mais evidentes observadas durante a necrópsia de cães experimentalmente infectados com *L. chagasi* foram a esplenomegalia e linfadenomegalia, sendo que, não foi observado nenhum cão com hepatomegalia. Nossos resultados concordam parcialmente as descrições desses autores, pois realmente, quando consideramos a avaliação do fígado quanto ao seu aumento de tamanho (hepatomegalia) esse somente foi observada em dois cães. Entretanto, mesmo

a olho desarmado, algumas lesões, não descritas pelos autores acima, merecem destaque em nosso trabalho como: áreas brancacentas distribuídas aleatoriamente na face parietal convexa e face visceral concava do órgão em cinco cães; presença de congestão em dez cães e áreas sugestivas de degeneração em onze cães.

Sabe-se que a lesão básica na LV ocorre devido a um envolvimento inicial dos macrófagos (Keenan et al., 1984), 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 SMF (Tafuri et al., 2001). Assim, em um estudo histopatológico do fígado de um cão com LV, proveniente de área endêmica de LVZ no Brasil, os aspectos histopatológicos apontavam para presença de granulomas intra-lobulares constituídos por macrófagos, por vezes parasitados. Além disso, puderam-se observar células epitelióides, pequeno número de linfócitos, plasmócitos e raros neutrófilos. Outras lesões notadas foram: hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, intensa congestão dos sinusoides e moderado infiltrado inflamatório mononuclear ao redor dos espaços-porta com trombose hialina dos vasos (Tafuri et al., 2001).

De forma assertiva, esses resultados corroboram nossos dados, pois em todos os grupos avaliados foi identificado algum tipo de inflamação crônica granulomatosa. Somados a isso, em dois cães do grupo controle pudemos observar formações sugestivas de trombose assim como descrito por Tafuri et al. (2001). Entretanto, acrescidos a esses aspectos histopatológicos, merece destaque, em nossos resultados, o quadro de degeneração hidrópica. Esse tipo de degeneração esteve presente em pelo menos 45,45% dos cães de

cada grupo chegando a atingir a frequência de 75% no grupo tratado com alopurinol (Alo). Nossos resultados também indicaram que, apesar de não observarmos diferença estatística entre os grupos em relação a esse processo degenerativo, pudemos verificar que o grupo tratado com Alo, assim como o tratado com a associação Ant + Alo apresentaram-se mais acometidos, tanto por maior prevalência de casos, quanto por médias mais elevadas referentes a intensidade de manifestação. Assim, considerando que as alterações mais expressivas ocorreram nos grupos Alo e Ant + Alo, em relação ao processo degenerativo; acrescido de um processo fibrosante no grupo Ant + Alo e grupo LipV + Alo, podemos ponderar que essas alterações podem ser decorrentes da ação do alopurinol e não do antimoniato, uma vez que, o grupo Ant não apresentou quadro de degeneração tão significativo e tão pouco o de fibrose. Apoiando nossos resultados, em relação à ação do antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos sobre o tecido hepático, Moura (2007) não descreve essas alterações degenerativas e fibrosantes nos cães de seu experimento.

O alpurinol (4-hydroxypyrazolol [3,4-d] pirimidina) foi desenvolvido em 1956 (Robins, 1956); sendo que, descrições sobre seus efeitos colaterais, no homem, apareceram logo após seu lançamento, com primeira morte diretamente relacionadas a sua utilização em 1970 (Kantor, 1970). Segundo Singer e Wallace (1986), os efeitos nocivos do alopurinol têm sido atribuídos à toxicidade (supressão da medula óssea), hipersensibilidade (lesão hepática, lesão renal, eosinofilia, leucocitose), interações medicamentosas com ampicilina e reações idiopáticas (ictiose e lesões da retina). Entretanto, até o momento não foram descritos efeitos colaterais nos cães devido a sua

utilização. Mesmo em experimentos como o de Sasanelli et al. (2007), os quais adotaram um protocolo terapêutico que se fundamentava na administração de 20mg/Kg/12h *per os* de alopurinol.

Antes e após o início do tratamento, nós avaliamos o perfil bioquímico hepático de todos os cães. Segundo Lassen (2004), os parâmetros usados para avaliar o fígado podem ser divididos em testes de enzimas séricas que detectam lesão de hepatócitos ou colestase e testes funcionais. Sendo que, as primeiras compreendem: as aminotransferases ALT e AST; sorbitol desidrogenase (SD), lactato desidrogenase isoenzima 5 (LD5) e a glutamato desidrogenase (GLDH), ao passo que, aquelas que avaliam a colestase compreendem: a fosfatase alcalina (FA) e a gama-glutamiltransferase (GGT). Os testes funcionais incluem as substâncias produzidas no fígado (proteínas totais, albumina, globulina, uréia, fatores de coagulação e glicose), bem como as substâncias que dependem de processamento metabólico ou excreção (bilirrubinas, ácidos biliares, amônia, colesterol e os pigmentos). Como demonstrado em nosso trabalho, os valores observados antes do início do tratamento apenas foram alterados quando consideramos a FA (Amorim et al., 2011). Embora as alterações degenerativas observadas ao exame histopatológico do fígado dos animais tratados com associação com alopurinol fossem intensas, as enzimas de avaliação da função desse órgão aqui estudadas não apresentaram modificações ao longo do tratamento, condizentes a esse quadro. Assim, segundo da Siva (2011), que avaliou os aspectos bioquímicos desses cães, dentre outros, observou que os valores séricos de FA diminuíram, ao longo dos momentos de avaliação, para os grupos Ant, Ant+Alo e Alo; enquanto houve um incremento no grupo LipV. Os

valores referentes à AST, no tempo 200, apresentaram-se estatisticamente inferiores nos grupos Ant+Alo e LipV+Alo quando comparados aos dos grupos controle (C) e LipV, enquanto o grupo Alo apresentou valores inferiores comparado ao do grupo controle (C), com $p < 0,05$.

A presença de formações granulomatosas indicou, assim como os resultados de Moura (2007), números estatisticamente inferiores no grupo Ant ($\bar{x} = 1,714 \pm 0,755$) quando comparados à média observada para o grupo LipV ($\bar{x} = 3,167 \pm 0,752$). Contrariamente, não observamos diferença entre o grupo Ant e controle (C). De forma semelhante, os cães tratados com Alo ($\bar{x} = 1,50 \pm 0,952$), Ant + Alo ($\bar{x} = 1,667 \pm 0,516$) e LipV + Alo ($\bar{x} = 1,750 \pm 0,700$) apresentaram médias estatisticamente inferiores quando comparadas aquela obtida para o grupo LipV. Os nossos resultados que apontam para diminuição do perfil inflamatório em cães tratados com alopurinol são confirmados por Sasanelli et al. (2007). Esses autores avaliaram as proteínas de fase aguda em cães naturalmente infectados com *L. infantum* durante e após tratamento com alopurinol. O esquema terapêutico preconizado empregou a administração de alopurinol, 20mg/Kg/q12h *per os*, até remissão completa dos sinais clínicos e normalização dos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos cães. Os resultados indicaram que, conjuntamente a remissão desses sinais, houve uma redução significativa dos valores referentes à proteína C-reativa e a haptoglobulina.

Segundo Murray (2001), a eficácia e intensidade da resposta granulomatosa é determinada tanto por fatores do parasito quanto do hospedeiro. Giunchetti et al. (2008) ao estudarem cães naturalmente infectados com *L. chagasi* observaram que a intensidade das alterações inflamatórias

estava associada com maior carga parasitária. Assim sendo, a ausência de formas amastigotas avaliada pela técnica da IHQ no grupo tratado com Ant + Alo, assim como a presença de apenas um cão positivo para o grupo Ant e dois para o grupo Alo, provavelmente estão relacionadas com uma diminuição do estímulo inflamatório e conseqüentemente com a presença de menor número de granulomas. Apoiando esses dados, os pesos relativos apresentaram-se inferiores nesses grupos com perfil inflamatório mais discreto e com menor estímulo parasitário.

BAÇO

A recuperação de uma infecção requer a geração de uma resposta imunológica eficiente que pode eliminar, ou pelo menos controlar, o patógeno infectante. No entanto, a indução da resposta imunológica também poderia ser responsável pelo desenvolvimento de patologias que acompanham a infecção independente do patógeno (Fiocruz, 2012).

O baço constitui o segundo maior órgão linfoide secundário do corpo, sendo de grande importância no controle da LV. Durante o curso da doença, o baço 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. Esses incluem o próprio parasito, viável ou debrís, células apresentadoras de antígenos e linfócitos.

Segundo Keenan et al. (1984), o quadro de esplenomegalia constituiu a alteração necroscópica mais notável, em cães experimentalmente infectados

com *L. chagasi* e *L. donovani*. Moura (2007), avaliando cães submetidos a protocolo terapêutico, cita que os achados macroscópicos esplênicos mais evidentes foram o aumento de volume do órgão, aspecto rugoso da cápsula e congestão. De forma confirmatória, em nosso experimento, a esplenomegalia não só esteve presente em pelo menos um animal de cada grupo experimental, como também apresentou maior prevalência quando comparada a hepatomegalia. Assim, podemos citar que grupos como o LipV e o controle (C) apresentaram pelo menos 50% dos animais comprometidos com essa lesão, e como critério confirmatório seus respectivos pesos relativos foram os mais elevados. Moura (2007) ainda avaliando o peso relativo do baço, entre os grupos experimentais, verificou relativa melhora no grupo lipossomal (Ant). Nossos resultados reproduzem esses dados, pois o grupo Ant apesar de não ter mostrado diferença estatística em comparação aos outros grupos, apresentou melhora dessa alteração.

A polpa branca, formada por tecido linfóide, representa o compartimento imunologicamente ativo do baço. Histologicamente, três regiões principais são identificáveis: a bainha linfóide periarteriolar (PALS), os folículos linfóides, contidos nas PALS e a zona marginal esplênica, que separa a polpa branca da polpa vermelha (Van Ewijk e Nieuwenhuis, 1985). A zona marginal contém grande quantidade de células B pré-ativadas, sendo que o fluxo sanguíneo significativamente reduzido, devido ao *sinus*, permite íntimo contato entre o antígeno e a célula efetora; após estímulo antigênico, as células B ativadas podem migrar para o folículo primário, iniciando o processo de formação do centro germinativo; enquanto, os linfócitos T são encontrados predominantemente na PALS (Zandvoort e Timens, 2002).

Em todos os grupos avaliados, algum tipo de comprometimento histopatológico foi observado, sendo que, as alterações fundamentais foram depleção da bainha linfóide periarteriolar; hiperplasia e hipertrofia dos cordões de Billroth e presença de granulomas do tipo *Wirchowianos* caracterizados pela presença de macrófagos hipocorados (cromatina frouxa e citoplasma amplo) e vacuolizados, parasitados ou não com formas amastigotas de *Leishmania*. A presença de folículos linfóides secundários, demonstrando resposta do tipo humoral a antígenos, foi mais expressiva, tanto em prevalência quanto em intensidade nos grupos Alo e Ant + Alo, quando comparados aos demais. Quando avaliamos a depleção da área T dependente verificamos que os grupos Ant , Ant + Alo e Alo obtiveram as menores médias indicativas da depleção dos linfócitos T quando comparados aos outros grupos, apesar da ausência de diferença estatística. Assim, embora em todos os grupos houvesse a presença de granulomas ditos *Wirchowianos*, o estudo morfológico indica uma relativa melhora quanto à capacidade de estimular uma resposta imune do tipo celular principalmente quando consideramos o grupo Ant + Alo; uma vez que somado a isso, esse grupo não apresentou positividade na IHQ.

Strauss-Ayali et al. (2007) avaliando a resposta imune esplênica em seis cães experimentalmente infectados com *L. infantum*, 8.6×10^8 amastigotas por via intravenosa, tratados por três meses com alopurinol (20mg/Kg pv/dia), observaram que a carga parasitária esplênica, avaliada por RT-PCR, reduziu significativamente, quando comparada aos resultados anteriores. Em nosso trabalho, a avaliação da positividade em amostras de baço, pela técnica da IHQ, revelou que apenas um animal apresentou formas amastigotas no grupo tratado somente com alopurinol; ao passo que, não foi possível detectar

amastigotas nas amostras obtidas do grupo tratado com a associação de antimoniato e alopurinol (Ant + Alo). Contrariamente a esses resultados, três animais (50%), pertencentes ao grupo do antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas nanométricos (Ant), apresentaram-se positivos pela IHQ. Mancianti et al. (1988), Liste e Gascin (1995) e Denerolle e Bourdoiseau (1999) corroboram esses dados com a descrição da falha na cura parasitológica em cães com LV tratados somente com os antimoniais pentavalentes livre (Sb^{+5}). Entretanto Moura (2007), utilizando formulação lipossomal, indica em seus resultados que o protocolo de tratamento foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço quando comparado aos outros grupos.

LINFONODO

A linfadenopatia generalizada é um achado clínico frequentemente descrito na LVC (Ciaramella et al., 1997; Ferrer et al., 2002; Lima et al. 2004; Costa Val, 2004; Moura et al., 2007; Toplu, 2011). Como descrito por esses autores, essa alteração constituiu um dos achados clínicos mais frequentes, em vários momentos de avaliação, ao longo do nosso experimento.

A avaliação do peso relativo do linfonodo cervical superficial não demonstrou diferença estatística entre os grupos avaliados. Entretanto, devemos considerar que houve uma influencia positiva, quanto a diminuição dos pesos relativos, nos grupos Ant + Alo, LipV + Alo e Alo. Da mesma forma, Moura (2007) também não verificou redução do peso, do mesmo linfonodo, no grupo antimoniato. Assim, podemos atribuir ao alopurinol essa influência positiva sobre o peso relativo dos mesmos.

Confrontando os achados histopatológicos com os de Keenan et al. (1984) e Toplu et al. (2011) pudemos identificar tantos pontos em comum quanto divergentes. Inicialmente, Toplu e colaboradores (2011) descrevem que todos os linfonodos, cervical superficial e poplíteo, avaliados nos cães com LV (n=22), apresentavam inflamação capsular crônica associada à fibroplasia. Em nosso estudo, de forma semelhante, encontramos linfadenite capsular em pelo menos 40% dos cães de cada grupo experimental, sendo que, em grande parte essa se apresentava associada a proliferação de tecido fibroso. Avaliando a região cortical do linfonodo, de cães também com LV, Keenan et al. (1984) ressaltam a presença de centro germinativo evidentes com moderada depleção da região paracortical. Por outro lado, Toplu et al. (2011) descrevem a presença de hiperplasia folicular estando essa associada ou não a presença de centro germinativos em 12 cães (54,54%). Nossos resultados reafirmam os estudos de Toplu et al. (2011), quanto a presença de uma hiperplasia folicular difusa, na região cortical e paracortical, sem a necessidade da presença do nódulo linfoide secundário. Além disso, a manifestação de depleção da região paracortical, descrita por Keenan et al. (1984), somente foi evidenciada em um cão do grupo do grupo LipV. A avaliação da região medular evidenciou a presença de hiperplasia e hipertrofia de plasmócitos, linfócitos, linfoblastos e macrófagos, que constituem os cordões medulares, em 18 dos 22 cães (Toplu et al., 2011). Assim como descrito por esses autores, nós encontramos pelo menos 81,81% dos cães, de cada grupo experimental, com padrão semelhante a esse.

Avaliando as principais alterações histopatológicas no linfonodo de cães com LV, com ou sem expressão clínica da doença, Lima et al. (2004)

descreveram que a hiperplasia/ hipertrofia das zonas cortical e medular foram as mais frequentes. Esses autores sugerem que a condição imunopatológica presente no linfonodo constitui um reflexo da inflamação crônica difusa promovida na LVC e independe da sintomatologia clínica dos cães. Contrariamente, Giunchetti et al. (2008) descrevem que a hipertrofia/ hiperplasia da zona cortical estavam presentes nos cães assintomáticos e oligossintomáticos, enquanto o quadro de atrofia da cortical foi evidenciado no cães sintomáticos. Nossos resultados, assim como os de Lima et al. (2004) não apontam modificação do padrão histopatológico em relação a condição clínica do animal. Somado a isso, encontramos uma tênue influencia em relação a diminuição da celularidade nos seios medulares dos cães tratado com Ant + Alo e Alo; sendo que, os outros aspectos investigados não apresentaram modificação do padrão histopatológico em relação ao protocolo de tratamento utilizado. Corroborando nossos dados, Moura (2007) não encontrou melhora das alterações histopatológicas no grupo tratado com antimoniato. Entretanto, apesar dessa autora descrever diminuição da densidade de parasitos nesse grupo, nossos resultados são discordantes, já que o grupo Ant apresentou positividade semelhante aos grupos LipV e controle (C). Contrariamente, aos resultados relativos à IHQ da pele, fígado e baço, o grupo Ant + Alo apresentou positividade em um cão na avaliação parasitológica do linfonodo cervical superficial.

9.0 CONCLUSÕES

- 1- O tratamento envolvendo o alopurinol, principalmente associado ao antimonial pentavalente encapsulado com lipossomos nanométricos, promoveu significativa redução do parasitismo tecidual (pele, fígado e baço) e melhora clínica de todos os animais ;
- 2- O tratamento nas diferentes condições experimentais, apesar da melhora clínica, não foi capaz de modular a resposta imune do tipo celular (frequência da população linfocitária CD4/CD8) nos cães estudados;
- 3- A expressão de CR3 e TLR-2 nos monócitos CD14⁺ apesar das variações observadas ao longo da cinética dos diferentes protocolos de tratamento não apresentaram correlação com a melhora clínica dos animais;
- 4- Cães tratados com alopurinol, principalmente associado ao antimonial pentavalente encapsulado com lipossomos nanométricos, mostraram uma melhora clínica evidente caracterizada principalmente pela remissão dos sinais dermatológicos clássicos da leishmaniose visceral;
- 5- Cães tratados com alopurinol principalmente associado ao antimonial pentavalente encapsulado com lipossomos nanométricos mostraram diminuição das alterações histológicas na pele caracterizada principalmente pela menor frequência de dermatite crônica;
- 6- Cães tratados somente com alopurinol e cães tratados com antimoniato de meglumina encapsulado com lipossomos nanométricos

- apresentaram peso relativo do fígado significamente menor em relação ao grupo tratado com lipossomos nanometricos vazios;
- 7- Cães tratados com alopurinol com as diversas associações e cães tratados com antimoniato de meglumina encapsulado com lipossomos nanométricos, quando comparados ao grupo de cães tratados com lipossomas vazios, apresentaram diminuição no número de granulomas intralobulares hepáticos caracterizando uma resolução da hepatite crônica;
 - 8- Cães tratados com antimoniato de meglumina encapsulado com lipossomos nanométricos associado ao alopurinol apresentaram peso relativo do baço significamente menor em relação ao grupo tratado com alopurinol e controle;
 - 9- O tratamento nas diferentes condições experimentais não interferiu significativamente nas lesões esplênicas clássicas como a depleção da área T-dependente da polpa branca evidenciada microscopicamente na maioria dos animais estudados;
 - 10- Cães tratados com antimoniato de meglumina encapsulado com lipossomos nanométricos associado ao alopurinol e cães tratados somente com o alopurinol apresentaram uma redução significativa da celularidade dos seios medulares em comparação ao grupo com lipossomo vazio com tendência a um menor parasitismo tecidual;
 - 11- Postula-se que os animais sob os diferentes protocolos terapêuticos, apesar da melhora clínica e parasitológica, devam ser acompanhados, por um maior período de tempo, visto que alterações histológicas como fibrose e degeneração foram notadamente encontradas no fígado dos

animais tratados com antimoniato associado ao alopurinol e alopurinol sozinho.

10.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander, J., A.R. Satoskar, and D.G. Russell, *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*, 1999. 112(18): p. 2993-3002.
2. Alexandre-Pires, G., et al., Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010. 137(3-4): p. 275-83.
3. Alvar, J., et al., Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 2004. 57: p. 1-88.
4. Alves, W.A. and P.D. Bevilacqua, [Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997]. *Cadernos De Saude Publica*, 2004. 20(1): p. 259-65.
5. 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*, 2011. 6(11): p. e27679.
6. Ashford, D.A., et al., Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998. 59(1): p. 53-7.
7. Baneth, G. e Shaw, S.E., Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 2002. 106(4): p. 315-24.
8. Baneth, G. A review of treatment of canine leishmaniasis. In: *Canine leishmaniasis: moving towards a solution*, 2, 2002, Sevilha. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Sumène:Hoeschst Roussel Vet, maio, 2002. p.49-55.
9. Blackwell, J.M., Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1985. 79(5): p. 606-12.
10. Bourdoiseau, G., et al., Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 1997. 56(3-4): p. 345-51.
11. Braga, M.D., et al. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs

- using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1998. 31(5): p. 419-24.
12. Canãvate, C. et al. Leishmaniosis canina: diagnóstico. *Información Veterinária: La leishmaniosis canina 1a parte*, 2005. p.28-32.
 13. Carrio, J. and M. Portus, In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol*, 2002. 2: p. 11.
 14. Carter, C.R., et al., Complement receptor 3 deficiency influences lesion progression during *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, 2009. 77(12): p. 5668-75.
 15. Chang, K.P. and D. Fong, Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. *Ciba Found Symp*, 1983. 99: p. 113-37.
 16. Ciaramella, P., et al., A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, 1997. 141(21): p. 539-43.
 17. Corredor, A. et al. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. 1989. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.83: p.195.
 18. Costa Val, A.P. Tratamento da leishmaniose visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas. Tese (Doutorado). Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2004, 125 f.
 19. da Silva, S. M. Avaliação de um protocolo terapêutico de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, associado ao alopurinol, no tratamento da leishmaniose visceral canina. Tese (Doutorado), 2011, 205f.
 20. de Almeida, M.C., et al., Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003. 98(7): p. 861-70.
 21. de Amorim, I.F., et al., Humoral immunological profile and parasitological statuses of Leishmune vaccinated and visceral leishmaniasis infected dogs from an endemic area. *Vet Parasitol*, 2010. 173(1-2): p. 55-63.
 22. de Lima, E B. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana *Treatment of American cutaneous leishmaniasis*. *An Bras Dermatol*, 2007. 82(2): p.111-24.

23. 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*, 2003. 33(10): p. 2822-2831.
24. Deane, L.M. and M.P. Deane, Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1962. 4: p. 198-212.
25. Demicheli, C., et al., Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. *Biometals*, 1999. 12(1): p. 63-6.
26. Demicheli, C., et al., Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimoniate. *Applied Organometallic Chemistry*, 2003. 17(4): p. 226-231.
27. Demicheli, C. et al. Antimony(V) complex formation with adenine nucleoside in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002. (1570): p. 192
28. Denerolle, P. and G. Bourdoiseau, Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med*, 1999. 13(5): p. 413-5.
29. Desjeux, P. Urbanization of the leishmaniasis. In: *Canine leishmaniasis: moving towards a solution*, 2, 2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène: Hoeschst Roussel Vet, maio, 2002. p.49-55.
30. Desjeux, P., Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, 1996. 14(5): p. 417-23.
31. Dias, F. O. P et al. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro*. 2003. 19 (5): p.1373-1380.
32. Esquerro, J. P. A. *Leishmaniasis: de La biología y su control*. 2 ed. Madrid: Instituto de Salud Carlos. III, 2001. p.157-159.
33. Ferrer, L. Canine leishmaniasis in Spain: data for the clinician. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1989. 7(6): p. 293-5.
34. Ferrer, L., et al., Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Record*, 1995. 136(20): p. 514-6.

35. Ferrer, L. et al. Skin lesion in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*. 1988. 29. p. 381-388.
36. Ferrer, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: *Canine Leishmaniasis: An Update, 1, 1999*, Barcelona. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Sumène: Hoeschst Roussel Vet, agosto, 1999. p.6-10.
37. Figueiredo, M.M., et al., Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Histol Histopathol*, 2010. 25(7): p. 877-87.
38. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*, 1989. 170(6): p. 2081-95.
39. Flandin, J.F., F. Chano, and A. Descoteaux, 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*, 2006. 36(2): p. 411-20.
40. Frezard, F., Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1999. 32(2): p. 181-9.
41. Frezard, F., et al., Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. 45(3): p. 913-6.
42. Frezard, F., et al., Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2000. 33(7): p. 841-6.
43. Fusai, T., et al. Importance of drug carriers in the treatment of visceral leishmaniasis. *Med Trop (Mars)*, 1995. 55(1): p. 73-8.
44. Gama, M.E., et al., Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2004. 37(1): p. 129-36.
45. Grima, M. Z. Leishmaniosis canina: panorámica general de la enfermedad. *Información Veterinaria: La leishmaniosis canina 1ª parte*, p.14-18, 2005.
46. Garcia-Alonso, M., et al., Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 1996. 18(12): p. 617-23.

47. Genaro, O. Leishmaniose Visceral Canina Experimental. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1993. 146f.
48. Giunchetti, R.C., et al., Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008. 121(1-2): p. 23-33.
49. Giunchetti, R.C., et al., Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, 2008. 84(2): p. 269-77.
50. Gonçalves, R., et al., A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infect Dis*, 2005. 5: p. 39.
51. Gradoni, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Canine Leishmaniasis: Moving Towards A Solution*, 2, 2002, Sevilha. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Sumène: Hoeschst Roussel Vet, maio, 2002. p.7-15.
52. Gregoriadis, G., et al. Vaccine entrapment in liposomes. *Methods*, 1999. 19(1): p. 156-62.
53. Guerin, P.J., et al., Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, 2002. 2(8): p. 494-501.
54. Handman, E. and D.V. Bullen, Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 2002. 18(8): p. 332-4.
55. Jaffe, C. L. Prospective for a vaccine against canine leishmaniasis. In: *Canine Leishmaniasis: An Update*, 1, 1999, Barcelona. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Sumène: Hoeschst Roussel Vet, agosto, 1999. p.66-71.
56. Kantor, G.L., Toxic epidermal necrolysis, azotemia, and death after allopurinol therapy. *JAMA*, 1970. 212(3): p. 478-9.
57. Kavosi, G. et al. *Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in Toll-like receptor signaling. *Experimental Parasitology*, 2010. 124(2): p. 214-8.

58. Keenan, C.M., et al., Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Vet Pathol*, 1984. 21(1): p. 80-6.
59. Killick-Kendrick, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v.65, p.37-42, 1990.
60. Koutinas, A.F., et al., Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. *Vet Dermatol*, 2010. 21(6): p. 572-7.
61. Koutinas, A.F., et al., A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 2001. 98(4): p. 247-61.
62. Koutinas, A. F.; et al. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Veterinary Dermatology*. 1993. 3 (3), p. 121-130.
63. Lainson, R. and E.F. Rangel, *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005. 100(8): p. 811-27.
64. Fichoux, Y., et al., Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999. 37(6): p. 1953-7.
65. Lainson, R e Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W. Killick-Kendrick, R. *The Leishmaniasis in biology and medicine*. New York: Academic, Press, 1987. p1-120.
66. Lassen, E D. Laboratory evaluation of the liver. In: Thrall, M A.; Baker, D C.; Campbell, T W.; Denicola, D; Fettman, M J; Lassen, E D; Rebar, A.; Wieser, G. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. Cap. 23, p.355-375.
67. Lima, W.G., et al., Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*, 2004. 92(1): p. 43-53.
68. 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*, 2007. 117(1-2): p. 129-36.
69. Liste, F. and M. Gascon, Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Record*, 1995. 137(1): p. 23-4.

70. Locksley, R.M. and J.A. Louis, Immunology of leishmaniasis. *Curr Opin Immunol*, 1992. 4(4): p. 413-8.
71. London, C.A., A.K. Abbas, and A. Kelso, Helper T cell subsets: Heterogeneity, functions and development. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1998. 63(1-2): p. 37-44.
72. Maia-Elkhoury, A.N., et al., Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cadernos De Saude Publica*, 2008. 24(12): p. 2941-7.
73. Mancianti, F., et al., Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trop Med Parasitol*, 1986. 37(2): p. 110-2.
74. Marsden, P.D., et al., High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1985. 34(4): p. 710-3.
75. Martinez-Moreno, A. et al. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 1993. 51(1-2): p. 49-59.
76. Martinez-Moreno, A., et al., Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 1995. 48(3-4): p. 209-20.
77. Mauricio, I.L., et al., Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, 1999. 119 (Pt 3): p. 237-46.
78. Michalick, M. S. M. Spreading of visceral leishmaniasis in urban area of Belo Horizonte, MG, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1993, 88, suppl.I: p.53.
79. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.-Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
80. Molina, R., et al., Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999. 60(1): p. 51-3.
81. Moreno, J. and J. Alvar, Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 2002. 18(9): p. 399-405.
82. Mosmann, T.R., et al., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 1986. 136(7): p. 2348-57.

83. Mosser, D.M. and P.J. Edelson, The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *Journal of Immunology*, 1985. 135(4): p. 2785-9.
84. Moura, E. P. Estudo histopatológico, imuno-histoquímico e imunológico de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 2007. 100 f.
85. Murray, H.W., Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*, 2001. 82(5): p. 249-67.
86. Neto, R. T. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose¹ *Histopathological pattern of exfoliative and ulcerative skin lesions in dogs with leishmaniasis*. *Ciências Agrárias*. 2008. 29 (3): p. 667-676.
87. 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*, 1999. 67(2): p. 117-30.
88. Nieto, C.G., et al., Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, 1992. 45(1-2): p. 33-47.
89. Noli, C. and S.T. Auxilia, Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol*, 2005. 16(4): p. 213-32.
90. Palatnik-de-Sousa, C.B. and M.J. Day, One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors*, 2011. 4: p.197.
91. Palatnik-de-Sousa, C.B., et al., Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2001. 65(5): p. 510-7.
92. Pinelli, E., et al., Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, 1994. 62(1): p. 229-35.
93. Quinnell, R.J., et al., IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. 91(3-4): p. 161-8.
94. Quinnell, R. J. et al. Tissue Cytokine response in canine visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001. 183 (9): p.1421-1424.

95. Reis, A.B., et al., Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009. 128(1-3): p. 87-95.
96. Ribeiro, R.R. Biodistribuição, toxicidade e eficácia terapêutica da formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937). Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 2007. 149 f.
97. 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*, 2008. 52(7): p. 2564-72.
98. Robins, R.K., Potential Purine Antagonists .1. Synthesis of Some 4,6-Substituted Pyrazolo[3,4-D]Pyrimidines. *Journal of the American Chemical Society*, 1956. 78(4): p. 784-790.
99. 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*, 2007. 3: p. 11.
100. Santos-Gomes, G.M., et al., Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002. 88(1-2): p. 21-30.
101. Saridomichelakis, M.N., et al., Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniasis. *Vet Dermatol*, 2007. 18(4): p. 227-33.
102. Sasanelli, M., et al., Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. *Vet Res Commun*, 2007. 31 Suppl 1: p. 335-8.
103. SHAW, J.J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. In: FARREL J., ed., *World Class Parasites: Leishmania*, v.4, *Kluwer Academic Publishers*. Boston, Dordrecht, London, 2003.
104. Schettini, D.A., et al., Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2003. 36(2): p. 269-72.
105. Schettini, D.A., et al., Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2005. 38(12): p. 1879-83.

106. Schettini, D.A., et al., Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int J Pharm*, 2006. 315(1-2): p. 140-7.
107. Silveira, F.T., et al., A longitudinal study on the transmission dynamics of human *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi infection in Amazonian Brazil, with special reference to its prevalence and incidence. *Parasitology Research*, 2009. 104(3): p. 559-67.
108. Singer, J.Z. and S.L. Wallace, The allopurinol hypersensitivity syndrome. Unnecessary morbidity and mortality. *Arthritis and Rheumatism*, 1986. 29(1): p. 82-7.
109. Slappendel, R.J. e E. Teske. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet Q*, 1997. 19(1): p. 10-3.
110. Solano-Gallego, L., et al., Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 2009. 165(1-2): p. 1-18.
111. Stanley, A.C. and C.R. Engwerda, Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*, 2007. 85(2): p. 138-47.
112. Strauss-Ayali, D., G. Baneth, and C.L. Jaffe, Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*, 2007. 38(4): p. 547-64.
113. 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*, 1996. 38(2): p. 81-9.
114. Tafuri, W.L., M.R. de Oliveira, and M.N. Melo, Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 2001. 96(3): p. 203-12.
115. Tafuri, W.L., et al., An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, 2004. 292(1-2): p. 17-23.
116. Tassi, P., et al., Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Research in Veterinary Science*, 1994. 56(2): p. 144-50.

117. Tesh, R.B., Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995. 52(3): p. 287-92.
118. Teva, A. et al. Introdução à Imunologia. In: Molinaro, E. M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, 2009. Cap. 1, 32-33.
119. Toplu, N. and A. Aydogan, An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. *Parasitology Research*, 2011. 109(4): p. 1051-7.
120. Torres, M., et al., Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*, 2011. 188(3): p. 346-51.
121. Valladares, J.E., et al., Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Veterinary Record*, 1996. 138(8): p. 181-3.
122. Van Ewijk, W. e Nieuwenhuis, P. Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. *Experientia*, 1985. 41(2): p. 199-208.
123. Vianna, G. Comunicação à Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Arq. Bras. Med.* 1912. (2): p. 426.
124. World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis. World Health Organization Technical Report Series, v.793, p.106, 1990.
125. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en_>. Acesso em janeiro de 2012.
126. 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*, 2006. 203(1): p. 177-88.
127. 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*, 2006. 2: p. 17.
128. Zandvoort, A. e Timens, W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clinical and Experimental Immunology*, 2002. 130(1): p. 4-11.

129. Zulueta, A.M., et al., Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999. 61(6): p. 945-50.

ANEXOS

ANEXO 1



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 211/2007**, relativo ao projeto intitulado "*Avaliação imunológica e histopatológica de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi, tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos e alopurinol*", que tem como responsável **Wagner Luiz Tafuri**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 03/2008**.

Este certificado expira-se em **12/ 03 / 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 211/2007**, related to the project entitled "*Immunological and histopathological evaluation of dogs with visceral leishmaniasis submitted to treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol*", under the supervision of **Wagner Luiz Tafuri**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 12, 2008**.

This certificate expires in **March 12, 2013**.

Belo Horizonte, 14 de Março de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 2

Data: ___/___/___

FICHA CLÍNICA INDIVIDUAL

Nome:

Baia:

Número do chip:

Grupo de Tratamento:

EXAME FÍSICO

Peso: _____ Kg/PV **Temperatura:** _____ °C **Hidratação:** _____

Estado Geral: Hiperatividade Normal Apatia Depressão

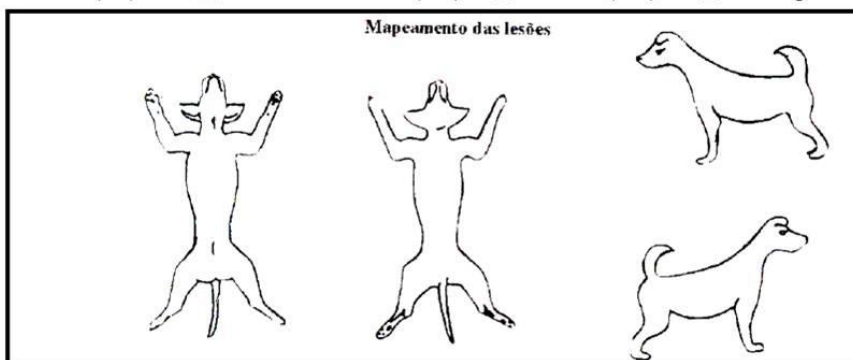
Cond. Corporal: Obesidade Normal Emaciação Caquexia

Linfoadenopatia: Submandibulares Pré-escapulares Poplíteos

Mucosas: Normal Hipocorada Hipercorada Outra

Exame Dermatológico:

- Dermatite Esfoliativa (DE) Hiperkeratose (HC) Alopecia (AL) Hipotricose (HI)
 Seborréia Seca (SS) Seborréia Úmida (SU) Úlcera (UL) Onicogrífose (ON)



Outras Alterações:

- Osteomuscular (OM) S. Nervoso (ON) TGI (TG) Geniturinário(GU)
 Oftalmopatias (OF) Cardiorrespiratório (CR) _____ ()

CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA:

- Assintomático Oligossintomático Sintomático

Comentários: _____

ANEXO 3

QUADRO 1

Valores hematológicos de referência do hemograma para cães segundo Bistner et al. (2002).

Parâmetro (unidade)	Valores normais para cães
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,5-8,5
Hemoglobina (g/dL)	12-18
Hematócrito (%)	37-55
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5,5-16,5
Neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,5-12,5
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,5-5,0
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,1-1,2
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,1-1,2
Plaquetas ($\times 10^5/\mu\text{L}$)	1,5-5,0

ANEXO 4

QUADRO 2

Valores bioquímicos de referência para cães segundo Bistner et al. (2002).

Parâmetro (unidade)	Valores normais para cães
ALT (UI/L)	10-88
AST (UI/L)	10-88
Fosfatase alcalina (UI/l)	10-80
Bilirrubina total (mg/dL)	0,1-0,6
Proteínas totais (g/dL)	5,30-7,80
Albumina (g%)	2,3-3,8
Globulinas (g%)	2,3-5,2
Creatinina (mg/dL)	0,5-1,5
Uréia (mg/dL)	10-25

ANEXO 5

Gelatina Especial

Para o preparo dessas lâminas, elas devem estar limpas. Enquanto se prepara a solução de gelatina, deixe-as em água destilada. Preparo da solução: aquecer a água destilada e acrescentar a gelatina deixando-a dissolver. Uma sugestão é usar o agitador magnético com aquecimento. Adicionar o sulfato de cromo e potássio (PA), obtendo uma solução verde-azulada. Filtrar essa solução, ainda morna, utilizando um algodão, esperar a solução esfriar, adicionar as lâminas e deixar por 30 minutos. Escorrer bem e secar por 24 horas, cobertas. Após esse período, as lâminas estão prontas para serem usadas ou guardadas.

ANEXO 6

Hematoxilina e Eosina

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

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

ANEXO 7

FICHA DE NECROPSIA

Data: / /

Nome do animal:

Grupo:

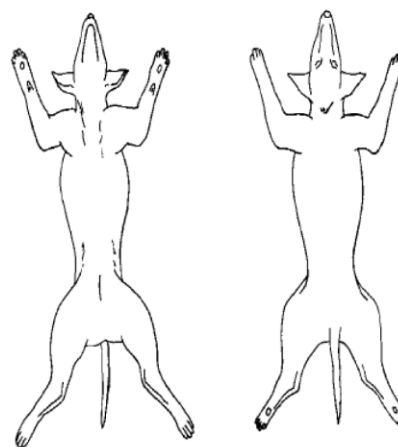
ACHADOS MACROSCÓPICOS

Estado geral do animal (Condição clínica, estado nutricional)

Cavidades naturais e mucosas (Pálpebras, conjuntiva e olhos, narinas, boca, pavilhão auricular, ânus e genitais)

Tegumento (pele, pêlos, unhas, mamas, bolsa escrotal)

Peso (Kg)



Ventral

Dorsal

Incisão primária - região axilar e inguinal – e **longitudinal mediana** (gordura subcutânea, musculatura)

Linfonodos superficiais (aspecto, volume, cor, forma, consistência) e peso(g):

Submandibulares Cervicais superficiais Poplíteos

Cavidades corpóreas (Torácica e abdominal) (distopias; aderências e fluidos - quantidade/ mL, coloração e tipo)

1. Primeiro conjunto (baço e epíplon - aspecto, volume, cor, forma, consistência)

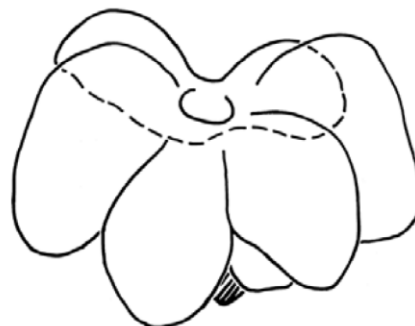
Baço

Peso(g):

2. Segundo conjunto (diafragma, fígado e vesícula biliar; pâncreas e início do duodeno - aspecto, volume, cor, forma, consistência)

Fígado

Peso(g):



3. Terceiro conjunto (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon reto, ânus e linfonodos - aspecto, volume, cor, forma, consistência)

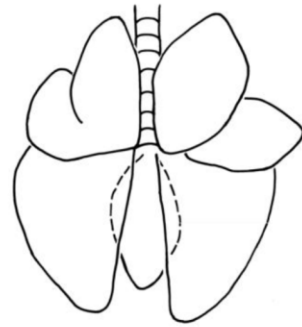
4. Quarto conjunto - Sistema geniturinário (macho: pênis, prepúcio e testículos; fêmea: vagina, corpo e cornos uterinos, tuba uterina e ovários; rins, ureteres, bexiga, uretra - aspecto, volume, cor, forma, consistência)

Rim (cm) E D

5. Quinto conjunto (Língua, faringe, laringe, esôfago, traquéia, pulmões e coração - aspecto, volume, cor, forma, consistência)

Sistema respiratório (traquéia, brônquios, linfonodos)

Pulmão (g) E D



Ventrículo Direito



Ventrículo Esquerdo



Fluxo Aórtico

Comparar o diâmetro longitudinal com o transversal

Pericárdio, epicárdio,
miocárdio, endocárdio,
válvulas, vasos coronários