

**ALDAIR JUNIO WOYAMES PINTO**

**ESTUDO CLÍNICO, HISTOLÓGICO E PARASITOLÓGICO DO  
TRATO GASTRINTESTINAL DE CÃES INFECTADOS COM  
*Leishmania (Leishmania) infantum.***

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Programa de Pós Graduação em Patologia**

**Belo Horizonte – MG**

**2014**

Aldair Junio Woyames Pinto

**ESTUDO CLÍNICO, HISTOLÓGICO E PARASITOLÓGICO DO  
TRATO GASTRINTESTINAL DE CÃES INFECTADOS COM  
*Leishmania (Leishmania) infantum.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Investigativa da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia - área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Wagner Luiz Tafuri  
Co-Orientador: Prof. Marcelo Vidigal Caliari

**Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina/UFMG  
2014**

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

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Wagner Luiz Tafuri, que desde quando cheguei ao LPL (antigo NIPE), me proporcionou todas as conquistas, que nunca fechou portas para mim dentro da universidade, somente as abriu e deixou que eu pudesse chegar aonde cheguei, e contrariar o que muitos não acreditavam. Uma pessoa de um coração repleto de bondade. Se metade do mundo tivesse um coração assim, com certeza as pessoas seriam diferentes.

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

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

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

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

Aos colegas do Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL), Belinha, Lucélia, Carol, Igor, Tassiane, Greg, Aline, Débora, Vitor, entre outros por serem além de colegas de trabalhos, amigos que nos movem para frente, sempre.

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

A Belinha além de uma grande pesquisadora uma mulher de determinação e do coração que cabe o mundo, pesquisadora que hora nenhuma hesitou em ajudar. Uma mulher que deixou escorrer lágrimas quando fez seu primeiro PCR, merece um lugar entre os bons.

A Lucélia, muito carinhosa e companheira que sempre ajudou com poucas palavras, mas sempre com um sorriso.

A Clínica Veterinária Padre Eustáquio representada pelos colegas Dr. Rodrigo, Dr. Richer, Dr. Diogo, Dr. Adriana, Dr. Leandro Dona Rosângela, Ulisses, Léo, Meire, Luanila, sempre um sorriso e uma alegria.

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

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

À ANCLIVEPA-MG e seus membros: Dr. Bruno Divino, Dr. Willian, Dr. Abílio, Dr. Manfredo entre outros.

Ao Prof. Vítor Márcio Ribeiro pelos valiosos ensinamentos.

As técnicas Mirna, Olinda, Vânia pela ajuda contínua.

Ao Sr. Elmo José que cuida de cães como ninguém

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

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

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

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

A minha família, maravilhosa e alegre que nunca me deixou perder em nenhum momento da vida.

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

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

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

Deus abençoe a todos!

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

## Resumo

São poucas as descrições das alterações patológicas e parasitológicas relacionadas ao envolvimento do trato gastrointestinal (TGI) na leishmaniose visceral canina, sobretudo de forma sistemática. Assim, neste trabalho, objetivou-se um estudo sistemático, anatomopatológico e parasitológico do TGI de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*. Após confirmação sorológica (RIFI e ELISA) e parasitológica (esfregaço de medula óssea), os cães foram divididos clinicamente em três grupos: sintomáticos (n=6) quando a manifestação de pelo menos um sinal clínico sugestivo de leishmaniose visceral; assintomáticos (n=6) quando da ausência de sinais clínicos e o grupo controle não infectado (n=5). Os animais foram cedidos pelo centro de zoonoses de Ribeirão das Neves e Carandaí, MG, região metropolitana de Belo Horizonte e área não endêmica da doença, consecutivamente. Os animais foram eutanasiados e necropsiados com coleta dos seguintes segmentos do TGI: esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto. Fragmentos de todos os segmentos citados foram coletados em triplicata e fixados: (1) formalina tamponada 10%, solução de Carnoy's e Acetona absoluta. OS tecidos após fixação foram incluídos em resina de glicol-metacrilato (GMA) e parafina para as colorações rotineiras de histologia e reações de imunohistoquímicas. As amostras do TGI foram utilizadas para colorações (H&E) e especiais (azul de toluidina, Dominici e PAS). Após padronização da técnica de inclusão em resina de GMA foram realizados estudos qualitativos e quantitativos (morfométricos) utilizando microscopia óptica. Os principais sinais clínicos da doença foram dermatites não esfoliativas e a onicogribose. Na análise microscópica, em todos os animais infectados, observou-se um notável aumento da celularidade da lâmina própria e submucosa em todos os segmentos do TGI em comparação com os animais controles. Lâminas feitas de tecidos incluídos em GMA forneceu uma análise morfológica com qualidade superior quando comparada aos tecidos incluídos em parafina, por apresentar maiores detalhes celulares confirmando o predomínio das células mononucleadas, difusamente localizadas na lamina própria (mucosa) e submucosa, representadas pelos plasmócitos, linfócitos e macrófagos. Células polimorfonucleares como neutrófilos e eosinófilos eram raramente observadas em todos os casos estudados. Macrófagos com morfologia peculiar, núcleo grandes (em relação as outras células) com cromatina frouxa e citoplasma amplo foram visualizados, as vezes vacuolizados com grande numero de formas amastigotas de *Leishmania*. A imuno-histoquímica de tecidos em GMA não foi satisfatória como comparada com tecidos parafinados. Amastigotas eram encontradas em maior proporção no intestino grosso (ceco, colón e reto) e delgado (estômago, duodeno, e íleo). Não foram encontrados marcações de amastigotas em esôfago e jejuno dos cães infectados. A técnica de inclusão em GMA em tecido canino mostrou-se de grande importância para as avaliações histológicas das amostras de TGI canino, apresentando um melhor resultado, principalmente no que diz respeito as colorações especiais, principalmente quando avaliados os mastócitos pelo azul de toluidina. Observou-se uma redução dessas células no em todos os segmentos de cães infectados. Comprovou-se a atrofia do epitélio em alguns segmentos de cães infectados quando comparados aos controles. Assim, concluímos que a técnica histológica do GMA é uma excelente ferramenta histológica para estudos morfológicos de amostras de TGI canino que reintera a presença de uma inflação crônica difusa ao longo de todo o TGI, sem formação de granulomas, com redução do número de mastócitos e atrofia epitelial em ambos os cães assintomáticos e sintomáticos.

## Abstract

There are few descriptions of pathological and parasitological changes related to the involvement of the gastrointestinal (GIT) tract in canine visceral leishmaniasis especially systematically studies. Thus, this work aimed to a systematic study, pathological and parasitological GIT of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. After serological confirmation (IFAT and ELISA) and parasitological (bone marrow smear), the dogs were divided clinically into three groups : symptomatic (n = 6) when the expression of at least one clinical sign suggestive of visceral leishmaniasis; asymptomatic (n = 6) when the absence of clinical signs and the uninfected control group (n = 3). The animals were provided by zoonoses center of Ribeirão das Neves and Carandaí, MG, Belo Horizonte metropolitan and non-endemic area of the disease, consecutively . The animals were euthanized and necropsied to collect the following segments of the GIT: esophagus, stomach , duodenum , jejunum , ileum , cecum , colon and rectum. Fragments of all segments cited were collected in triplicate and determined: (1) 10 % buffered formalin, (2) Carnoy 's solution and (3) absolute acetone . After fixation tissues were embedded in glycol methacrylate resin (GMA) and paraffin for routine histology staining and immunohistochemical reactions. GIT samples were used for staining (H & E) and special staining (toluidine blue ,Dominici and PAS). After standardization of inclusion in GMA resin qualitative and quantitative (morphometric) using optical microscopy studies were performed. The main clinical signs of disease were exfoliative dermatitis and onychogryphosis . On microscopic examination, in all infected dogs, there was a remarkable increase in cellularity of the lamina propria and submucosa in all segments of the GIT compared with control dogs. Blades made of tissues embedding in GMA provided a morphological analysis with superior quality when compared to paraffin-embedded tissues, due to the higher cellular detail confirming the predominance of mononuclear cells diffusely located in the lamina propria (mucosa) and submucosa , represented by plasma cells , lymphocytes and macrophages. Polymorphonuclear cells such as neutrophils and eosinophils were rarely observed in all cases studied. Macrophages with peculiar morphology, large core (relative to other cells) with loose chromatin and large cytoplasm were visualized, sometimes vacuolated with large number of *Leishmania* amastigotes. Immunohistochemistry on tissue GMA was not satisfactory as compared to paraffin embedded tissues. Amastigotes were found in greater proportion in the large intestine (caecum, colon and rectum) and small intestine (stomach, duodenum, and ileum) . No markings of amastigotes in the esophagus and jejunum of infected dogs were found. The technique of embedding in GMA in canine tissue proved to be of great importance for the histological evaluations of samples of canine GIT, with a better result , especially as regards the special staining , especially when evaluated mast cells with toluidine blue. There was a reduction in these cells in every segment of infected dogs . Proved the epithelial atrophy in some segments of infected dogs when compared to controls . Thus, we conclude that the GMA histological technique is an excellent tool for morphological studies Histological samples of canine GIT confirm the presence of a diffuse chronic inflation throughout the GIT tract without formation of granulomas , which reduces the number of mast cells and epithelial atrophy in both asymptomatic and symptomatic dogs



## Lista de Figuras

Figuras	Legenda	Página
Figura 1	Fotomicrografia de material necessário para inclusão de tecidos em glicol metacrilato (GMA). Em (A) kit LEICA HISTORESIN (Leyca, Alemanha) contendo a solução BASIC RESIN (#), Packet ativador (seta) e a solução de infiltração (X). Em (B) detalhe da BASIC RESIN (#) e solução de Hardner (£) que formam a solução de inclusão. Em (C) a forma de plástico contendo o compartimento onde é depositado o tecido (**) e o compartimento superior (*) onde é depositado a resina acrílica de dentista (RA) e o bloco de madeira (WP). Em (d) o completo bloco de resina de metacrilato, detalhe de madeira (WP) com resina acrílica de dentista (RA) a resina de metacrilato na forma sólida com o tecido (**).	24
Figura 2	Programa KS400 (Carl Zeiss®, Orberkochen, Germany) em seu interface de análises. Em (A) imagem de tamanho reduzido. Utilização de ferramenta desenho para selecionar manualmente a área de epitélio intestinal. Em (B) área demarcada do epitélio intestinal preenchido por ferramenta de balde em amarelo. Esta coloração é identificada pelo programa que fornece em micrometros quadrados a área demarcada. Após em (C) a imagem é aberta em tamanho real (1024X768) e o software possibilita a contagem dos tipos celulares. Em (D) visualiza-se os valores obtidos pela contagem dos tipos celulares e a janela de ferramenta que permite a quantificação da área de lamina própria em micrômetros quadrados.	28
Figura 3	(A-D): Corte Histológico de Fragmentos de Intestino Delgado (Duodeno) Incluídos em Glicol Metacrilato (GMA) de Cão Sintomático Naturalmente Infectado com <i>Leishmania (L) infantum</i> : (A) Microfotografia panorâmica mostrando epitélio glandular íntegro. Notar intensa celularidade da lamina própria evidenciada pelos núcleos celulares corados pela Hematoxilina. Barra = 32µm; (B-D) Detalhes da figura anterior mostrando presença de células mononucleares distribuídas difusamente na lamina própria. Em (B) notar intensa presença plasmócitos com morfologias peculiares: alguns com citoplasma acidófilo caracterizando células em degeneração hialina (corpúsculo de Russel) (setas) e outras com formação de vacúolos intracitoplasmáticos que histologicamente sugerem a dilatação do complexo de Golgi (cabeças de seta). Em (C), no centro da figura, observar plasmócitos com citoplasma basofílico dispostos em fileira na lamina própria. Também há plasmócitos em degeneração hialina (corpúsculo de Russel) (seta) e outros com formação de vacúolos intracitoplasmáticos (cabeças de seta) Em (D) formação de um granuloma na camada muscular constituído por células epitelióides (setas), macrófagos (seta fina), plasmócitos (seta larga) e pequenos linfócitos (cabeças de seta); Hematoxilina-Eosina (H&E). Barras = 16µm. Ept: Epitélio; LP: Lamina Própria; MM: Muscular da Mucosa; CM: Camada Muscular; Cap: Capilar; Ar: Arteriola; FN: Feixe Nervoso; VS: Vaso Sanguíneo.	33
Figura 4	(A-F): Fragmentos de Intestino Grosso (Cólon) (A-D) E Intestino Delgado (E-F) Incluídos em Metacrilato de Cão Naturalmente Infectado com <i>Leishmania infantum</i> Sintomático: (A) Microfotografia panorâmica mostrando as camadas mucosa (epitélio glandular íntegro) e muscular da mucosa. Notar celularidade da lamina própria corados pela Hematoxilina. Barra = 64µm; (B) Figura anterior em maior aumento mostrando presença de células mononucleares distribuídas difusamente na lamina própria. (C-D). Detalhes da figura anterior mostrando presença de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> no interior de macrófagos na lamina própria (seta). Em (D) notar a presença de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> no interior de macrófagos na submucosa (cabeça de seta). Hematoxilina-Eosina (H&E). Barra = 16µm. (E) observar presença de macrófagos parasitados distribuídos pela lamina própria. Hematoxilina-Eosina (H&E). Barra = 16µm. (F) observar presença de formas amastigotas vacuolizadas dentro do citoplasma de macrófagos na lamina própria (setas). Hematoxilina-Eosina (H&E). Barra = 8µm GL: Glândula de <i>Lieberkühn</i> com presença de células calciformes; LP: Lamina Própria; MM: Muscular da Mucosa; Sbm: Submucosa.	34
Figura 5	Duodeno (7, 8 e 9) e cólon (10, 11 e 12) de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> (reação estreptoavidinaperoxidase). (7-9) lâmina própria do duodeno; notar amastigotas em todo o tecido. Barra= 32µm. (10-12) lâmina de cólon; notar amastigotas concentradas perto da muscular da mucosa distante do lúmen. Barra= 64 µm, 32 µm e 16 µm reação estreptoavidinaperoxidase.	37
Figura 6	Duodeno de cão naturalmente infectado com <i>Leishmania infantum</i> : amastigotas visualizadas por imunomarcção (reação estreptoavidinaperoxidase). (A) lâmina com amastigotas distribuídos por todo o tecido (reação estreptoavidinaperoxidase, Bar = 64µm,) (B) amastigotas difusamente distribuídas (seta) (reação estreptoavidinaperoxidase, Bar = 32µm); (C) intensa marcação de amastigotas distribuídos por toda lâmina própria (seta) (reação estreptoavidinaperoxidase, Bar = 16µm). LG: glândula de <i>Lieberkühn</i> com células calciformes; LP: lâmina; MM: muscular da mucosa; Sbm: Submucosa, PP; Placas de Peyer.	41

Figura 7	Intestino delgado de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (L.) infantum</i> (AD). Em (A) as formas de amastigotas imunomarcadas de <i>Leishmania</i> em lâmina própria (setas pretas) (Barr = 16µm, reação, 2µm de espessura). Em (B) formas de amastigotas imunomarcadas em lâmina própria (setas pretas) e marcações inespecífica em núcleos (setas amarelas) e amastigotas de <i>Leishmania</i> não marcadas (setas rosa) (Barr = 16µm reação, 2µm de espessura). Em (C) amastigotas de <i>Leishmania</i> marcadas com baixa intensidade (setas pretas) e marcações inespecífica (setas amarelas) (Barr = 8 um e reação, 2µm de espessura). Em (D) marcações intracelulares de amastigotas <i>Leishmania</i> (setas pretas), marcações inespecíficas (setas amarelas) e amastigotas de <i>Leishmania</i> não marcadas (setas rosa) (Barr = 8 um estreptoavidinaperoxidase reação, 2µm de espessura)	43
Figura 8	Tecido canino incluído em GMA 3µm. Em (A) fotomicrografia de fígado corados com hematoxilina-eosina: hepatócitos com preservação dos limites citoplasmáticos e nucleares (detalhe) Bar = 16 µm. Em (B) microfotografias do intestino grosso (cólon) em hematoxilina-eosina: observar as células da lâmina própria e epitélio intestinal intacta. Ver (detalhe) presença de células hemácias dentro dos vasos sanguíneos. Bar = 16 µm. Em (C) a região do íleo corada com azul de toluidina borato. Identificar a presença de mastócitos (seta vermelha) com preservação da arquitetura da histologia, fundo azul. Barra = 32 µm. Em (D) identificar e células coradas em vermelho (seta vermelha) e mastócitos degranulados (setas pretas) Bar = 16 µm. Em (E) observaram menor aumento na coloração PAS em vilosidade intestinal Barra = 32 µm. Em (F) Detalhe de (E) que indica a preservação da morfologia celular esta coloração pode ser comparado com H & E para a utilização de rotina de bar = 16 µm.	45
Figura 9	Fotomicrografia de Intestino Grosso de Cão Naturalmente infectado por <i>Leishmania infantum</i> Assintomático (B, D e F) e cão controle (A, C e E). Em (A) observar lamina propria (LP) contendo algumas células mononucleares, epitélio intestinal (Ept) íntegro e mastócitos corados em vermelho. Em (B) observar em lamina propria o aumento de células inflamatórias predominantemente mononucleares e mastócitos corado em vermelho (Barra = 32µm). Em (C) observar em maior aumento presença de mastócitos (seta vermelha) por toda região abaixo do epitélio e infiltrado perivascular (VS) predominantemente mononuclear com presença de plasmócitos (seta preta). Em (D) aumento do número de plasmócitos (seta preta) e presença de macrófagos (seta rosa), linfócitos (seta azul) e mastócitos (seta vermelha) (Barra=16 µm). Em (E) aumento da imagem (C) mostrando mastócitos (seta vermelha) e neutrófilo (seta verde). Em (F) aumento de (D) visualiza-se mastócitos (seta vermelha), linfócitos (seta azul), macrófago (seta rosa) e plasmócitos (seta preta) (Barra= 8 µm). Coloração de Azul de Toluidina, espessura 2 µm.	53

### Lista de Tabelas

Tabela	Legendas	Página
Tabela 1	Distribuição de marcações positivas de amastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i> pela técnica de imuno-histoquímica nos cães infectados(n=12):	38

## Lista de Gráficos

Gráficos	Legenda	Página
<b>Gráfico 1</b>	Alterações clínicas observadas no grupode cães naturalmente infectados com <i>Leishmania infantum</i> sintomáticos (n=6):	<b>30</b>
<b>Gráfico 2</b>	Avaliação das alterações histopatológicas nos cães infectados com <i>Leishmania (L.) infatum</i> do grupo sintomático (n=6) e assintomático (n=6)	<b>32</b>
<b>Gráfico 3</b>	Parasitismo tecidual pela técnica da estreptoavidina-peroxidase em todos os segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> (n=12).	<b>38</b>
<b>Gráfico 4</b>	Parasitismo tecidual pela técnica da estreptoavidina-peroxidase em todos os segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> dos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=5) e CL-46.	<b>39</b>
<b>Gráfico 5</b>	Parasitismo tecidual pela técnica da estreptoavidina-peroxidase em todos os segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> do grupos sintomáticos (n=6).	<b>40</b>
<b>Gráfico 6</b>	Parasitismo tecidual pela técnica da estreptoavidina-peroxidase em todos os segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> do grupos assintomáticos (n=6).	<b>42</b>
<b>Gráfico 7</b>	Área de epitélio do Trato Gastrointestinal de cães do grupo controle (n=5)	<b>47</b>
<b>Gráfico 8</b>	Área de epitélio do Trato Gastrointestinal de cães do grupo sintomático (n=6)	<b>48</b>
<b>Gráfico 9</b>	Área de epitélio do Trato Gastrointestinal de cães do grupo assintomático (n=6)	<b>48</b>
<b>Gráfico 10</b>	Avaliação da área de epitélio do TGI dos cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> (n=12) e grupo controle (n=5):	<b>49</b>
<b>Gráfico 11</b>	Avaliação morfométrica de plasmócitos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> (n=12) e cães não infectados (n=5).	<b>50</b>
<b>Gráfico 12</b>	Avaliação morfométrica de linfócitos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> (n=12) e cães não infectados (n=5).	<b>51</b>
<b>Gráfico 13</b>	Avaliação morfométrica de Macrófagos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> (n=12) e cães não infectados (n=5).	<b>52</b>
<b>Gráfico 14</b>	Avaliação morfométrica de Mastócitos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> (n=12) e cães não infectados (n=5).	<b>53</b>
<b>Gráfico 15</b>	Avaliação morfométrica de Granulócitos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> (n=12) e cães não infectados (n=5).	<b>55</b>
<b>Gráfico 16</b>	Área de lamina própria no TGI de cães infectados grupo Sintomático (n=6).	<b>56</b>
<b>Gráfico 17</b>	Área de lamina própria no TGI de cães infectados grupo Assintomático (n=6)	<b>57</b>
<b>Gráfico 18</b>	Área de lamina própria no TGI de cães infectados grupo Controle (n=5)	<b>57</b>
<b>Gráfico 19</b>	Área de lamina própria em segmentos do TGI de cães infectados e grupo Controle (n=5)	<b>57</b>

## Lista de Abreviaturas

TGI – Trato gastrointestinal  
ELISA - EnzymeLinkedImmunsorbentAssay  
GMA – resina de glicol metacrilato  
H&E – hematoxilina - eosina  
Lu. – Lutzomya  
LC – Leishmaniose cutânea  
MC – Leishmaniose muco-cutânea  
LV – leishmaniose visceral  
LVC – leishmaniose visceral canina  
CAPI- Centro de Aquisições e Capturas de Imagens  
LCD – Leishmaniose cutâneo disseminada  
LVH – leishmaniose visceral humana  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
CCZ – Centro de Controle de Zoonoses  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
PAS - ácido periódico-schiff  
RIFI - reação de imunofluorescência indireta  
TGI – trato gastrintestinal  
d.C – Depois de Cristo  
SFM – Sistema fagocítico mononuclear  
PA – Absoluto 100%

## SUMÁRIO

Sumário	Página
<b>1. Introdução</b>	<b>12</b>
1.1 As Leishmanioses	12
1.2 A Leishmaniose Visceral	12
1.3A Leishmaniose Visceral Canina	13
1.4 Comprometimento do Trato Gastrointestinal na LV	15
1.4.1 Comprometimento na LV:	15
1.4.2 Comprometimento na LVC:	16
<b>2. Objetivos</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivo Específico	18
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>19</b>
3.1 Animais	19
3.2 Distribuição dos Grupos Naturalmente Infectados e em Observação	19
3.3 Manuseio dos Animais	20
3.4 Protocolo anestésico e de eutanásia	20
3.5 Necropsia e coleta de amostras	21
3.6 Técnica de inclusão em GMA e de colorações histoquímicas no TGI canino:	22
3.7 Reação imuno-histoquímica para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> :	25
3.8 Processamento dos tecidos incluídos em parafina para reação imuno-histoquímica para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> :	25
3.9 Avaliação qualitativa do TGI por técnicas histoquímicas e imuno-histoquímica:	25
3.10 Análise morfológica:	26
3.11 Análise morfológica do parasitismo tecidual	26
3.12 Análise morfológica do epitélio, plasmócitos, linfócitos, macrófagos, mastócitos, granulócitos e lamina própria de segmentos do TGI, incluídos em metacrilato:	27
3.13 Análise estatística	29
3.14 CEUA	29
<b>4.0 Resultados</b>	<b>30</b>
4.1 Avaliação clínica	30
4.2 Avaliação Macroscópica	31
4.3 Avaliação histopatológica	31
4.4 Avaliação qualitativa pela imuno-histoquímica em tecidos incluídos em parafina	35
4.5 Avaliação quantitativa pela imuno-histoquímica em tecidos incluídos em parafina	37
4.6 Avaliação da imuno-histoquímica em tecidos incluídos em glicolmetacrilato em comparação com tecidos incluídos em parafina	41
4.7 Avaliação dos tecidos incluídos em glicolmetacrilato em comparação com tecidos incluídos em parafina usando as colorações de rotina e especiais:	42
4.8 Avaliação morfológica do TGI:	45
4.9 Avaliação morfológica do epitélio do TGI	45
4.10 Avaliação morfológica das células inflamatórias	48
4.10.1 Avaliação morfológica dos Plasmócitos do TGI	49
4.10.2 Avaliação morfológica dos linfócitos do TGI	49
4.10.3 Avaliação morfológica dos Macrófagos do TGI	50
4.10.4 Avaliação morfológica dos Mastócitos no TG	51
4.10.5 Avaliação dos Granulócitos no TGI	54
4.11 Avaliação morfológica da Lâmina Própria em TGI:	54
<b>5.0 Discussão</b>	<b>57</b>
<b>6.0 Conclusões</b>	<b>67</b>
<b>7.0 Referências Bibliográficas</b>	<b>68</b>
ANEXO A	74
ANEXO B	75
ANEXO C	78
ANEXO D	80

## 1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Leishmanioses

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

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

### 1.2 A Leishmaniose Visceral

A *Leishmania (Leishmania) donovani* é o agente etiológico da LV na China, Paquistão, China oriental, Nepal, Sudão, Bangladesh e Quênia; a *Leishmania infantum* nos países da Bacia do Mediterrâneo e a *Leishmania chagasi* nos países do Novo Mundo (Guerinet et al., 2002). De acordo com estudos moleculares essas duas últimas são consideradas co-específicas (Maurício, et al., 1999).

A LV é uma antroponose na Índia, Nepal, Paquistão, China e Bangladesh, ao passo que, apresenta um caráter de zoonose em países da Bacia do Mediterrâneo e América do Sul. No Brasil, a transmissão é feita pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* da espécie *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*. A *Leishmania infantum* também é transmitida pelo *Lutzomyia cruzi* no Brasil (Dos Santos et al., 2003) e *Lutzomyia evansi* na Colômbia e Venezuela (Bejarano et al., 2001; Feliciangeli et al., 1999).

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

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

Ainda não se sabe exatamente o porquê da maioria dos países da América Latina, não possuírem um controle eficaz da doença (Werneck et al. 2002; Bern et al. 2008; Zerpa et al., 2003). Dados epidemiológicos no Brasil apontam para um total de 50.060 casos clínicos de LV entre 1990 e 2006 perfazendo 90% do total de casos de LV nas Américas (sem levar em consideração os casos de subnotificação). Um fato que corrobora esses dados consiste na crescente urbanização e expansão para regiões ao sul do país, uma vez que inicialmente a doença atingia somente as regiões rurais do Nordeste (1980) e hoje grandes centros urbanos da

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

### **1.3 A Leishmaniose Visceral Canina**

A Leishmaniose visceral canina (LVC) tem grande importância epidemiológica, devido à alta prevalência e ao intenso parasitismo cutâneo dos cães, que favorece a infecção do vetor e a transmissão ao homem. O desenvolvimento e progressão da doença nos cães são altamente variáveis. Alguns cães desenvolvem a infecção sintomática, muitas vezes fatal, enquanto outros permanecem assintomáticos, ou desenvolvem um ou poucos sinais clínicos. Anormalidades dermatológicas nos cães sintomáticos são bastante comuns e variáveis quanto à caracterização e extensão; hiperqueratose, descamações, despigmentações e ulcerações principalmente nas extremidades dos membros e no focinho são facilmente encontradas (Solano-Galego et al., 2011).

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

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



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

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

#### **1.4 Comprometimento do Trato Gastrointestinal na LV:**

##### **1.4.1 Comprometimento na LV:**

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

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

#### 1.4.2 Comprometimento na LVC:

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

Hervás e colaboradores em 1996 relataram o comprometimento do TGI em um chagal (*Canis aureus*) com LV. Nesse animal foi observada hemorragia gástrica associada à presença de macrófagos parasitados com *Leishmania* na lâmina própria do estômago. Os autores também observaram infiltrado inflamatório difuso na mucosa e submucosa do intestino delgado e grosso composta predominantemente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa tanto em dissertação de mestrado (Silva, 2001) quanto em artigo científico (Silva et al. 2002), relataram formas amastigotas de *Leishmania* facilmente observadas ao longo de todas as porções do TGI (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon). De fato, Silva et al. (2002), independentemente das diferentes formas clínicas dos cães, descreveram a presença das amastigotas no interior de macrófagos de todas as camadas histológicas desses segmentos, a saber: mucosa (lâmina própria), submucosa, muscular da mucosa e camada muscular. Todavia, apesar do parasitismo intenso em todos os segmentos do TGI, não foi encontrado lesões macroscópicas associadas. A arquitetura do intestino, bem como a celularidade da lâmina própria não se alteram mesmo em presença de grande número de parasitos. Silva (2001) relatou diferenças estatísticas no parasitismo nas porções finais do TGI (ceco e cólon) que são mais intensos nesta região intestinal em comparação com as demais. A partir das revisões percebe-se uma grande variância nos achados clínicos associados com os achados anatomopatológicos, sendo os achados de cada trabalho importantes, porém pouco abrangentes na avaliação sistemática de

todo o sistema gastrintestinal. Assim, objetivamos dar continuidade a essa linha de pesquisa envolvendo o TGI na LVC, aprofundando nossos conhecimentos a respeito da morfologia, das alterações patológicas, do parasitismo bem como das suas associações ao quadro clínico geral e digestivo dos animais, avaliando o microambiente intestinal, mais precisamente a mucosa de todo o TGI. Ao que saibamos um estudo sistemático avaliando o perfil inflamatório e suas características correlacionadas com o status clínico do animal naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum* e a carga parasitária encontrada em todos os segmentos não foram realizados. Assim, esse projeto teve como objetivo principal ampliar nossa linha de pesquisa em um estudo abrangente, qualitativo e quantitativo, dos aspectos clínicos, parasitológicos e anatomopatológicos, com ênfase na caracterização do perfil celular presente na mucosa de todo o TGI, de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os aspectos clínicos, achados anatomopatológicos e parasitológicos do trato gastrointestinal de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Seleção de cães não infectados e naturalmente infectados por *L. infantum* mediante testes sorológicos, parasitológicos e posterior classificação clínica para distribuição em grupos sintomático, assintomático e controle;
2. Padronização do processamento histológico em resina de glicolmetacrilato (GMA) bem como das colorações de rotina (H&E) e colorações especiais (azul de toluidina, Dominici, PAS, prata amoniacal) em tecidos caninos;
3. Padronização da técnica de imuno-histoquímica (estreptoavidinaperoxidase) para visualização de formas amastigotas de *Leishmania sp.* em tecidos caninos incluídos em GMA;
4. Comparar a inclusão de tecidos caninos em GMA à parafina avaliando aspectos qualitativos (espessura, morfologia, colorações) e quantitativos (tempo, material gasto) em cortes histológicos.
5. Estudo anatomopatológico (macro e histopatológico) e morfométrico de plasmócitos, linfócitos, macrófagos, mastócitos e granulócitos de todos os segmentos do TGI de cães dos grupos experimentais;
6. Caracterização por imuno-histoquímica do parasitismo em todos os segmentos do TGI;
7. Avaliação morfométrica do tamanho de epitélio e lâmina própria de todos os segmentos do TGI;

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 12 cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ribeirão das Neves. A infecção foi previamente confirmada por exames sorológicos no próprio CCZ sendo os cães encaminhados posteriormente ao Canil Experimental do Instituto de Ciências Biológicas, do Departamento de Parasitologia da UFMG. Após a chegada dos cães, novos testes sorológicos foram realizados, através da reação de imunofluorescência indireta utilizando antígeno bruto (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) empregando o antígeno solúvel para ELISA convencional. Estes exames foram realizados no Laboratório de Patologia das Leishmanioses no Departamento de Patologia Geral e no Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia ambos no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Juntamente com os exames sorológicos, foram coletadas amostras de sangue de medula óssea esternal e aspirado de linfonodo cervical para confecção de esfregaços para exames parasitológicos.

Durante a avaliação clínica, cães classificados em sintomáticos, foram os que apresentaram pelo menos um sinal clínico sugestivo de leishmaniose visceral como, dermatites esfoliativas não pruriginosas, dermatites ulcerativas, alopecias, blefarites, onicogribose, caquexia, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, entre outros. Cães classificados como assintomáticos foram cães que não apresentaram nenhum sinal sugestivo de leishmaniose visceral como os descritos anteriormente.

Foram utilizados 5 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Carandaí-MG, área não endêmica para LVC. Esses cães foram submetidos aos mesmos cuidados relatados aos cães anteriormente descritos.

#### 3.2 Distribuição dos Grupos Naturalmente Infectados e em Observação

Os 17 cães foram assim distribuídos:

- Grupo I – Animais naturalmente infectados - Sintomáticos: seis cães adultos, sem raça definida, provenientes do CCZ de Ribeirão das Neves MG com exames diagnósticos sorológicos e parasitológicos positivos para *Leishmania*, que apresentaram de forma evidente sinais clássicos da LVC como dermatites esfoliativas não pruriginosas, dermatites ulcerativas,

alopecias, blefarites, onicogribose, caquexia, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, entre outros (Solano-Galego et al., 2011);

- Grupo II – Animais naturalmente infectados - Assintomáticos: seis cães adultos, sem raça definida, provenientes do CCZ de Ribeirão das Neves MG com exames diagnósticos sorológicos e parasitológicos positivos para *Leishmania*, aparentemente saudáveis sem sinais clínicos considerados comuns na doença;
- Grupo III – Controle: cinco cães, provenientes de área não endêmica (Carandaí, MG) com exames diagnósticos sorológicos e parasitológicos negativos para *Leishmania*, aparentemente saudáveis sem sinais clínicos de doenças;

### 3.3 Manuseio dos animais

Os cães permaneceram em um período de aproximadamente seis meses no canil. Receberam doses de vacina Vanguard<sup>®</sup> e anti-rábica Defensor<sup>®</sup> (Pfizer<sup>®</sup>, Brasil), bem como medicação anti-helmíntica oral de amplo espectro com pamoato de pirantel (144mg), praziquantel (50mg) e febantel (660mg) para cada dez quilos de peso (Helfine cães<sup>®</sup>, Agener União, Brasil) e repetidas mensalmente a partir da data da primeira administração. Foram empregados produtos tópicos contra ectoparasitos de efeito prolongado (Top Line<sup>®</sup>, Merial Saúde Animal) e coleiras repelentes contra flebotomíneos (Scalibor<sup>®</sup>, Intervet, Holanda).

Os cães foram mantidos no canil do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde receberam água e alimentação industrializada *ad libitum*. Foram distribuídos em baias coletivas, respeitando a lotação de cinco animais/baia. Estas foram diariamente higienizadas com hipoclorito de sódio a 1% e borrifadas trimestralmente com piretróides.

Com o objetivo de se obter grupos experimentais mais homogêneos os animais foram estratificados de acordo com o sexo, porte e idade. Estes permaneceram no canil por um período de acompanhamento uniforme, sendo que obrigatoriamente todos os procedimentos pertinentes ao estudo foram conduzidos nas dependências do canil.

### **3.4 Protocolo anestésico e de eutanásia**

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

A eutanásia dos animais cumpriu a Resolução nº 1000/2012, de 17 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, texto que atualiza a Resolução de no. 714/2002, alterada pela Resolução CFMV no. 876/2008 que dispõe sobre os Procedimentos e Métodos de Eutanásia em Animais e dá outras providências. Desta forma, depois do protocolo anestésico descrito seguiu-se a utilização de fenobarbitúrico Tipental sódico 2,5% (1mL/kg) (Tiopentax®, Cristália, Brasil) por via endovenosa até a obtenção do plano anestésico profundo e posteriormente foi administrado, por via endovenosa lenta, o curarizante T-61® (Intervet, Holanda) (0,3mL/Kg) até obtenção de parada cardiorrespiratória, relaxamento dos esfíncteres, ausência de pulso, miose e arreflexia.

### **3.5 Necropsia e coleta de amostras**

Após a constatação do óbito (descrito anteriormente), foi realizado o exame externo da carcaça. Foi examinada toda a cobertura corporal incluindo conduto auditivo, coxins, região interdigital e unhas, mucosas oral, ocular, genital. Posteriormente foi realizada a abertura da carcaça por uma incisão na região axilar com objetivo de liberar os ligamentos e músculos escapulares e costais e dos membros pélvicos pela desarticulação da cabeça do fêmur com a fossa acetabular. Realizou-se uma incisão de pele da região mentoniana até o púbis rebatendo toda a pele juntamente com a glândula mamária. A avaliação dos linfonodos superficiais (submandibulares, axilares, cervicais superficiais, poplíteos) foi feita considerando coloração e consistência. Coletaram-se amostras de linfonodos (cervical, axilar e poplíteo). Foi feita a abertura da cavidade abdominal por uma incisão da musculatura abdominal do processo xifoide até região inguinal, lateralmente, fez-se a secção da musculatura abdominal rente ao arco costal e retirado o baço juntamente com o omento rente à curvatura maior do estômago e coletado amostras aleatoriamente. Após foram retirados os intestinos entre o duodeno (região final do pâncreas) e intestino grosso (porção da ampola retal) pela secção do mesentério. Foi removido o conjunto fígado-estômago-duodeno-pâncreas através da secção da veia cava e

ligamentos entre estômago e esôfago. Após a retirada do trato gastrointestinal foram removidos os rins juntamente com os ureteres.

A retirada do complexo língua-esôfago-traqueia-pulmão e coração foi feita pela secção do pavimento da cavidade oral rente as asas da mandíbula e ossos hioides desligando a língua da carcaça e rebatida juntamente com o esôfago e traqueia até sua entrada no tórax. Posteriormente, foi aberta a cavidade torácica e retirado o complexo língua-esôfago-traqueia-pulmão e coração. O exame da destes órgãos foi feito pela secção mediana da língua avaliando possíveis alterações como nodulações e/ou presença de cistos. Posteriormente foi separado esôfago de traqueia. O esôfago foi aberto e os fragmentos foram coletados na sua porção distal, próximo a sua inserção no cárdia. A traqueia, os pulmões e o coração foram avaliados quanto à coloração, consistência e conteúdo. Durante o exame das vísceras abdominais rins, fígado, baço e pele abdominal foram avaliados quanto à coloração, consistência e conteúdo e coletados fragmentos de cada órgão em regiões aleatórias.

A avaliação do trato gastrointestinal feita inicialmente com o teste do colédoco, posteriormente feita incisão no duodeno, estômago e pâncreas coletando: no estômago amostras coletadas na região de corpo do estômago; no duodeno as amostras coletadas na região final de inserção do duodeno com pâncreas, que também foi coletado. O intestino foi disposto de forma uniforme e aberto por toda sua extensão. Amostras foram coletadas de jejuno, íleo, ceco, cólon e reto. A análise macroscópica de todos os órgãos foi feita levando-se em consideração critérios como, coloração, consistência e presença de lesões. Os fragmentos de todos os órgãos descritos anteriormente foram coletados em triplicata: uma amostra foi fixada em solução de formalina tamponada a 10% (pH 7,2) a 4°C por 48 horas, outra fixada em solução Carnoy's (álcool PA, clorofórmio PA, ácido acético PA 6:3:1) a 4°C por 3 horas e a terceira fixada em solução de acetona PA a menos 20°C por 7 dias. Posteriormente, os fragmentos fixados em formalina tamponada a 10% foram incluídos em parafina e os tecidos fixados em Solução Carnoy's e Acetona PA foram incluídos em resina plástica metacrilato.

### **3.6 Técnica de inclusão em GMA e de colorações histoquímicas no TGI canino:**

Os tecidos foram cortados na espessura de 2 cm e foram desidratados em álcool PA em três etapas de 30 minutos cada e em dois banhos de xilol 15 minutos cada. Em seguida, os tecidos foram incluídos em solução do kit HistoResin (Leyca®, Alemanha). Esta solução, chamada de *solução de infiltração* (1packet ativador diluído em 50ml de BASIC RESIN/LIQUID) é necessária para promover a penetração da resina no tecido, antes desta



atingir sua forma sólida. Os tecidos foram mantidos nesta solução por 16 horas (*overnight*) em constante agitação a 4°C. Posteriormente, foi feita a troca desta solução por uma nova solução de infiltração e o tecido foi mantido por mais 24 horas a 4°C em constante agitação. Após esta etapa, os tecidos foram colocados em formas quadradas de plástico de aproximadamente 2,5 cm em contato com gelo pela parte externa (a reação é exotérmica e polimeriza rapidamente em temperatura ambiente). À forma de plástico foi adicionada a *solução de inclusão* (15 ml de solução de infiltração associado a 1ml de Hardener, solução presente no kit que tem a função de polimerizar a reação). Após o posicionamento do tecido na forma de plástico, é retirado o gelo e a forma é deixada temperatura ambiente por 24 horas até a solução solidificar. Posteriormente à solidificação foi adicionada a resina acrílica de dentista (Jet® Clássico, Brasil) para fixar ao bloco circular de madeira. Que serve para encaixe do bloco GMA à base do micrótomo. Os tecidos incluídos em GMA foram cortados em micrótomo semiautomático (Mi, Reichert Jung, modelo 1140/Autocut) por lâminas de vidro, que conferem cortes semi-finos de 1-2µm. Este processamento foi realizado no Centro de Aquisições e Processamento de imagens (CAPI) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e foram utilizados para a avaliação anatomopatológica, morfométrica e imuno-histoquímica (Figura 1).

As colorações de rotina e especiais foram padronizadas a partir adaptação da apostila de inclusão e resina plástica descrita por Chiarini-Garcia (1996), (ver Anexos).

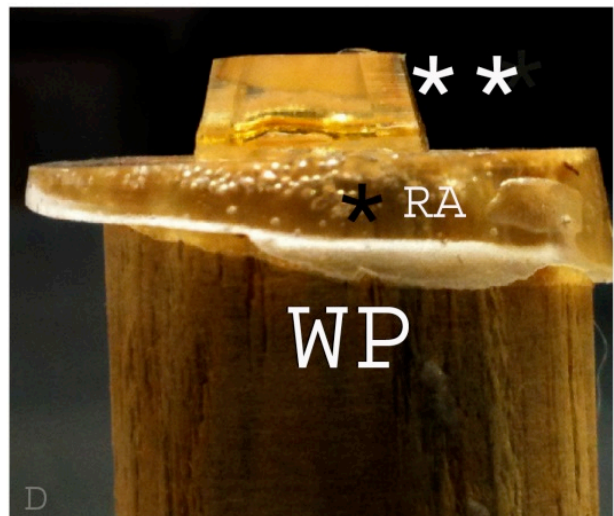


Figura1 (A-D): Fotografia do material necessário para inclusão de tecidos em glicolmetacrilato. Em (A) kit LEICA HISTORESIN (Leyca, Alemanha) contendo a solução BASIC RESIN (#), Packet ativador (seta) e a solução de infiltração (X). Em (B) detalhe da BASIC RESIN (#) e solução de Hardner (£) que formam a solução de inclusão. Em (C) a forma de plástico contendo o compartimento onde é depositado o tecido (\*\*), e o compartimento superior (\*) onde é depositado a resina acrílica de dentista (RA) e o bloco de madeira (WP). Em (D) o completo bloco de resina de metacrilato, detalhe do bloco de madeira (WP) com a resina acrílica de dentista (RA) a resina de metacrilato na forma sólida com o tecido (\*\*).

### **3.7 Reação imuno-histoquímica para formas amastigotas de *Leishmania*:**

- Para reação de imuno-histoquímica para marcações de formas amastigotas de *Leishmania* usou-se as seguintes soluções:
- Solução Tampão Fosfato Salino (PBS – “Phosphates Buffer Saline”- ph 7,2, 0,01M). Esta solução foi utilizada para lavagem das lâminas entre as etapas da técnica.
- Solução de Peróxido de Hidrogênio: Duas soluções foram utilizadas: a primeira para bloqueio da peroxidase endógena composta de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 4%, e a segunda para revelação da reação.
- Solução anti-soro de bloqueio: utilizou soro normal de leite em pó desnatado 12g diluídos em 200ml de PBS para bloqueio de sítios inespecíficos.
- Soro de cão naturalmente infectado (anticorpo primário) na diluição de 1:100, 1:50 e 1:10 (Tafuri et al., 2004)
- Anticorpo secundário: anticorpo anti-IgG de cão biotilado (Nordic Immunological Laboratories, Netherlands- batch: 5071 code: GAD/IgG H+L/Bio)

A descrição da técnica (Anexos)

### **3.8 Processamento dos tecidos incluídos em parafina para reação imuno-histoquímica para formas amastigotas de *Leishmania*:**

Os tecidos fixados em formalina 10% foram processados em histotécnico automático (AutoTechnicon, Model 2A, The Technicon Company, New York, USA) para desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo três fragmentos do mesmo segmento dos órgãos foram cortados em micrótomo (American Optical, Rotary 820, Leyca®, Alemanha) em espessura de 4µm e montados em lâminas previamente desengorduradas com álcool-éter e banhadas em solução gelatinosa de fixação. A marcação de formas amastigotas de *Leishmania* foi realizada pela técnica da estreptoavidina-peroxidase descrita por Tafuri e colaboradores (2004) (Ver Anexos).

### **3.9 Avaliação qualitativa do TGI por técnicas histoquímicas e Imuno-histoquímica:**

As análises histopatológicas dos segmentos do TGI foram realizadas em todos os tecidos incluídos em GMA e corados em H&E observando os seguintes parâmetros: avaliação morfológica das células e dos componentes de todas as camadas histológicas. Avaliação da existência ou não de fenômenos inflamatórios, degenerativos, presença de granulomas e classificação do infiltrado inflamatório.

As análises qualitativas das reações de imuno-histoquímica pela estreptoavidina-peroxidase foram feitas em todos os tecidos observando a presença de marcações positivas de amastigotas de *Leishmania* divididas em: parasitismo discreto (+); parasitismo moderado (+ +) e parasitismo intenso (+++) associando a sua distribuição na lâmina própria e classificando de acordo com sua distribuição topográfica: distribuição próxima ao lúmen intestinal e/ou distribuição próxima a muscular da mucosa.

### **3.10 Análise morfométrica:**

A análise morfométrica foi utilizada para:

- Quantificação do parasitismo tecidual de formas amastigotas de *Leishmania* marcados pela reação imuno-histoquímica em tecidos parafinados;
- Quantificação do epitélio do trato gastrointestinal em tecidos corados por colorações especiais;
- Quantificação da área de lâmina de própria do trato gastrointestinal em tecidos corados por colorações especiais;
- Quantificação de plasmócitos, linfócitos, macrófagos, mastócitos e granulócitos presentes na lâmina própria do trato gastrointestinal em tecidos corados por colorações especiais;

### **3.11 Análise morfométrica do parasitismo tecidual**

Usou-se cortes histológicos em parafina do esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto, submetidos à reação imuno-histoquímica para a identificação de formas amastigotas de *Leishmania*. Todos os cortes foram avaliados através da objetiva de 40X do

microscópio BX 40 (Olympus®, Pensilvânia, EUA) para a digitalização de 20 imagens aleatórias (resolução 1048X746) da submucosa do esôfago e da mucosa de cada órgão, através da microcâmara QColor 3 (Olympus®). Utilizando uma sequência de algoritmos do programa KS400 (Carl Zeiss®, Oberkochen, Germany), a área total de marcação imuno-histoquímica ( $\mu\text{m}^2$ ) de cada imagem foi calculada através da seleção dos pixels com tons de marrom e subsequente criação de uma imagem binária (Lima et al., 2007). A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por Caliarì (1997).

### **3.12 Análise morfométrica do epitélio, plasmócitos, linfócitos, macrófagos, mastócitos, granulócitos e lamina própria de segmentos do TGI, incluídos em metacrilato:**

Cortes histológicos incluídos em metacrilato do esôfago, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto, corados pela Azul de Toluidina foram avaliados através da objetiva de 40X do microscópio BX40 (Olympus®). Foram digitalizadas 20 imagens aleatórias (resolução 1024X768) da mucosa de cada órgão, excetuando no esôfago onde foi feita análise da submucosa, através da microcâmara QColor 3 (Olympus®). Através do mesmo programa de morfometria, foi construída uma sequência algorítmica capaz de fornecer a área total do epitélio e de lâmina própria em  $\mu\text{m}^2$  (Oliveira et al., 2012), bem como a contagem diferencial de células do infiltrado inflamatório. Através da segmentação de imagens, foram selecionados todos os pixels do epitélio e da lâmina própria para a criação de imagens binárias e cálculo das respectivas áreas em  $\mu\text{m}^2$ . Os diferentes tipos celulares presentes na lâmina própria foram contados manualmente e individualmente através de ferramentas do programa.

Todas as análises morfométrica foram feitas no Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

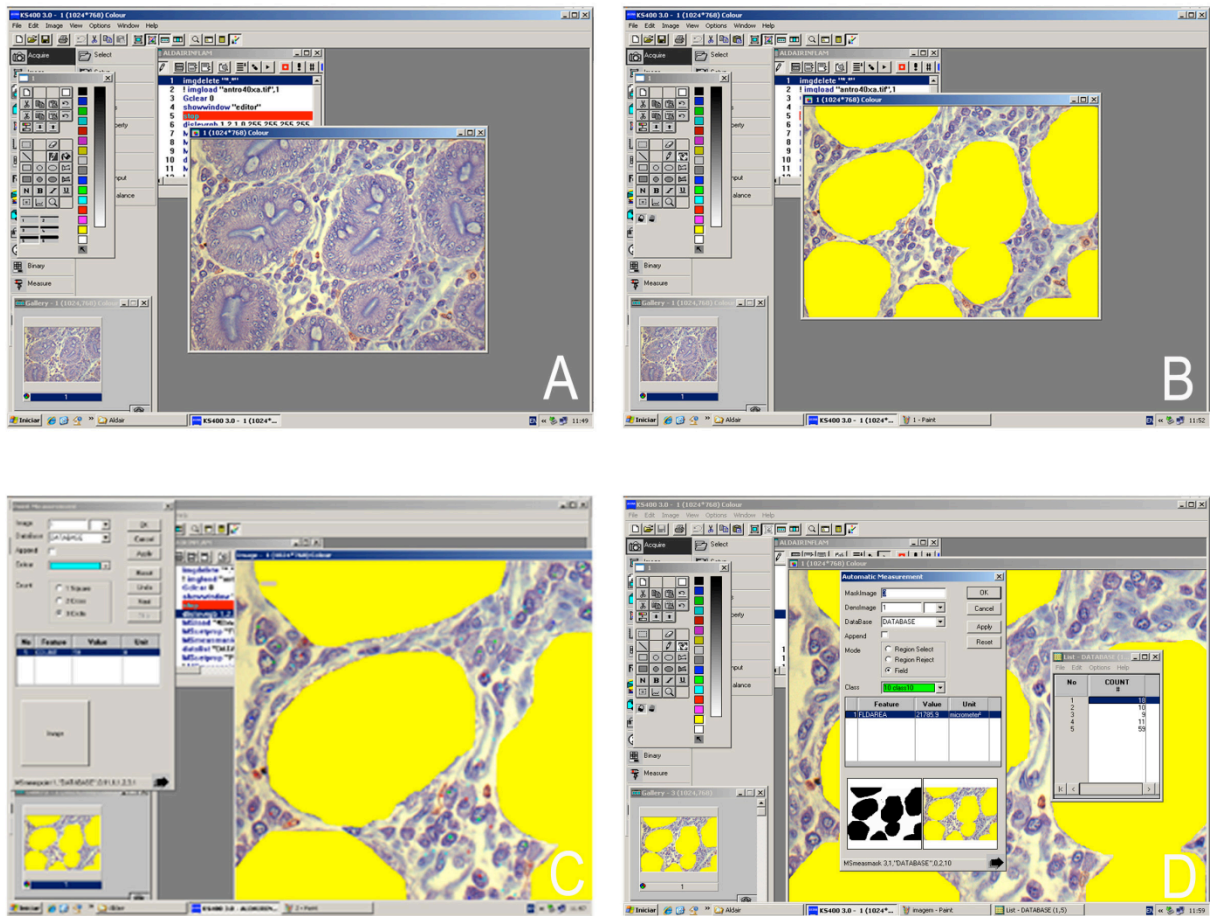


Figura 2 (A-D): Programa KS400 (Carl Zeiss®, Oberkochen, Alemanha). Em (A) janela do programa e imagem de intestino grosso de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* grupo sintomático. Em (B) seleção de epitélio intestinal. Em (C) Cálculo da área de lâmina própria e Contagem diferencial das células inflamatórias da lamina propria. Em (D) cálculo da área de lâmina propria em imagem binária.

### **3.13 Análise estatística**

De acordo com a natureza dos dados, a comparação dos três grupos foi realizada através dos testes de comparações múltiplas ANOVA, Diferença Mínima Significativa (DMS) para análise entre os diferentes grupos. O teste Tukey foi utilizado para analisar a diferença entre os seguimentos intestinais dentro do mesmo grupo. Para os dados não paramétricos (parasitismo entre os dois grupos) utilizou-se o teste Mann-Whitney, t student.

As análises foram realizadas por meio dos programas estatísticos computacionais Prism® 5,0, GraphPadInstat® e Minitab® 1.4, adotando um nível de significância menor que 5%.

### **3.14 CEUA**

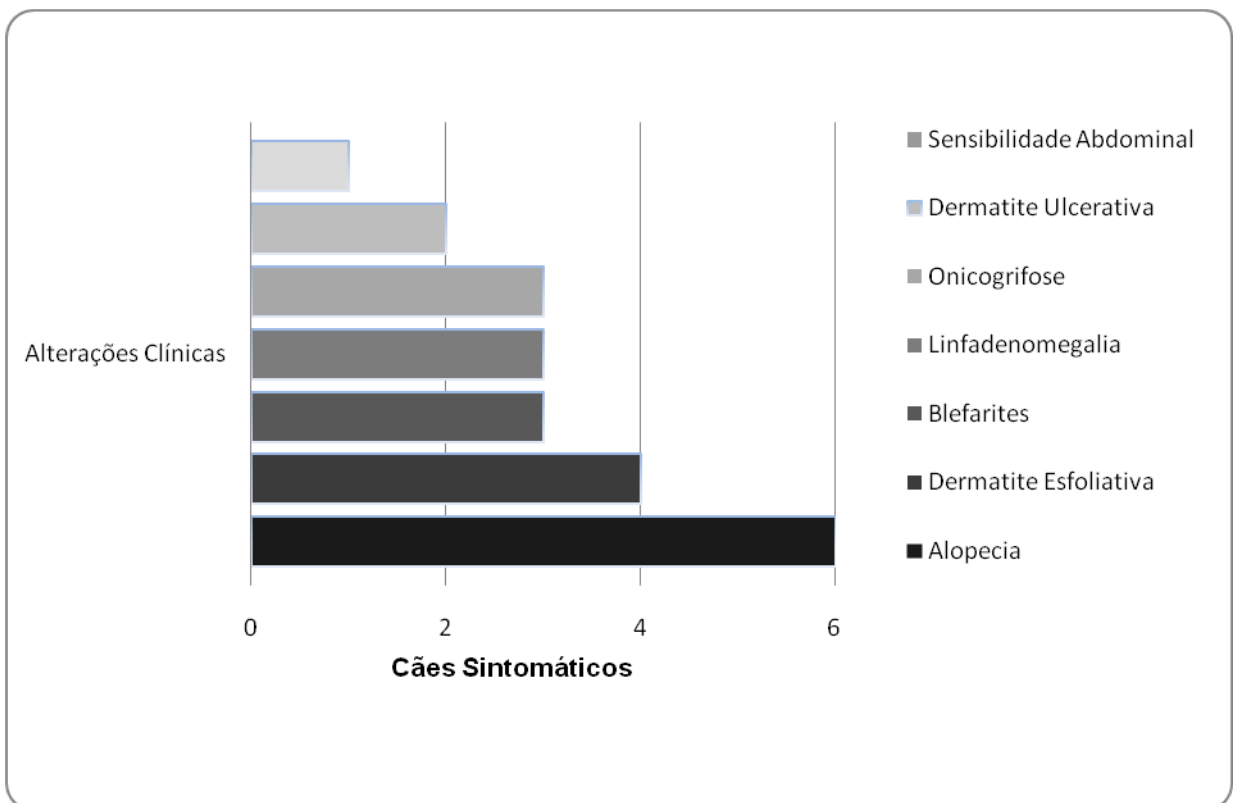
Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal CETUA/UFMG – protocolo N°. 218/09 (Anexo C).

## 4.0 Resultados

### 4.1 Avaliação clínica

Os animais pertencentes ao grupo sintomático apresentaram alterações clínicas sendo os principais achados correlacionados as lesões de pele como dermatites esfoliativas não pruriginosas com áreas de alopecias associada (4/6). Alguns apresentaram dermatites ulcerativas no pavilhão auricular, dorso e cauda (2/6) e onicogribose (3/6). Outras alterações clínicas visualizadas foram as blefarites associadas às alopecias periorcárias, linfadenomegalia generalizada (3/6) e sensibilidade à palpação abdominal (1/6). Como não foi mensurado peso vivo dos animais durante o período de experimento, não se pode afirmar a perda de peso, entretanto a diminuição do *score* corporal foi observada em dois dos animais do grupo.

**Gráfico 1: alterações clínicas observadas no grupo de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* sintomáticos (n=6):**





#### **4.2 Avaliação Macroscópica:**

Na análise macroscópica de todo o TGI dos cães do estudo, não foram visualizadas alterações anatomopatológicas. Em cinco cães (3 cães sintomáticos e dois assintomáticos) foram visualizados presença de helmintos nas porções de intestino delgado e grosso. Em um dos casos, o animal veio a óbito durante o período de quarentena (aproximadamente 10 dias). Durante a necropsia foi constatado a ruptura diafragmática com herniação dos órgãos abdominais para cavidade torácica sendo que este animal apresentou congestão hepática e pulmonar intensa, espessamento de alças intestinais, com áreas de necrose e torção e foi excluído do experimento.

#### **4.3 Avaliação histopatológica:**

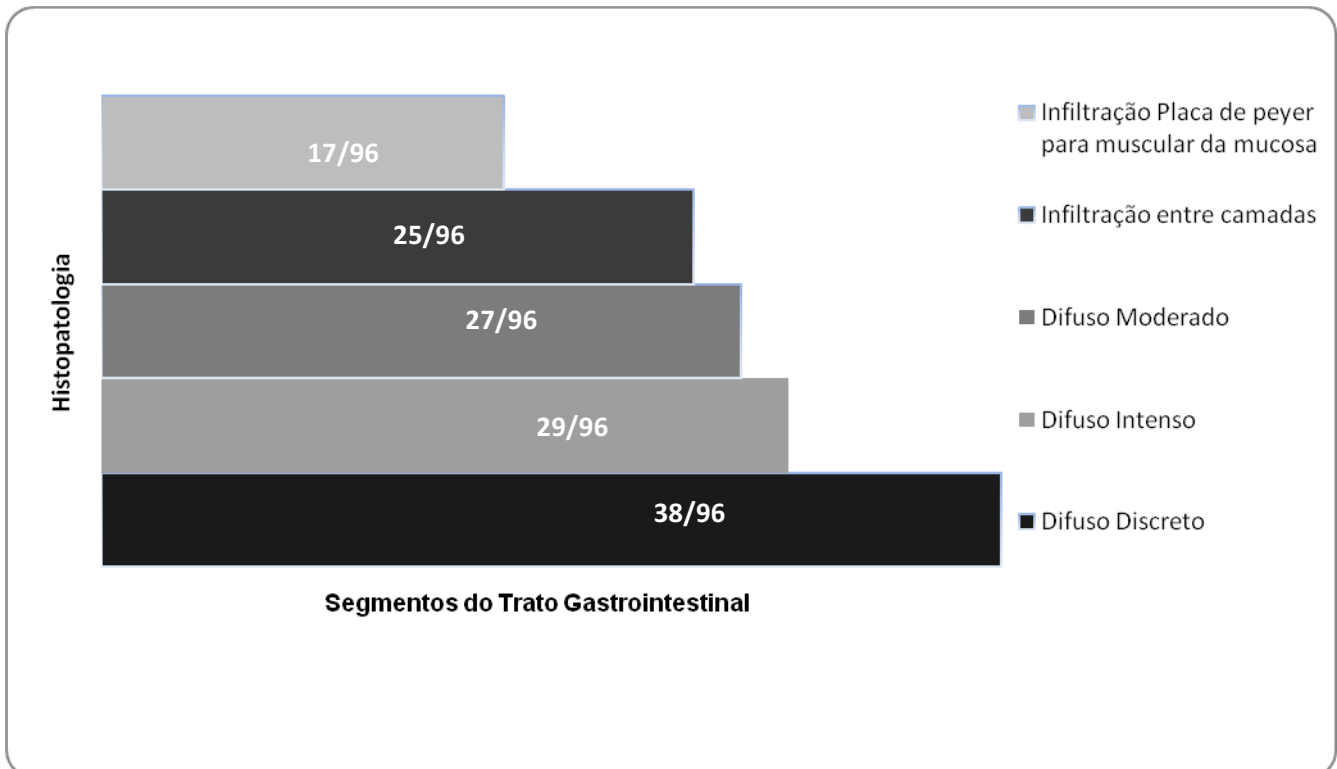
Em todos os cães infectados foi observado um aumento do número de células inflamatórias da lâmina própria e submucosa de todos os segmentos do TGI (com exceção do esôfago) em comparação com os animais controles. Havia predominância de plasmócitos, macrófagos, e linfócitos sendo raramente encontradas células polimorfonucleares como neutrófilos e eosinófilos. Com grande facilidade podiam ser vistos macrófagos com morfologia peculiar, com núcleos grandes com cromatina frouxa e com visualização do parasito ou a presença de vacúolos em seu interior.

Foi possível observar também, a presença de células epitelióides e/ou gigantes normalmente associadas com infiltrado mononuclear e uma discreta atrofia epitelial em alguns animais (Figuras 3). A análise microscópica pode revelar a presença de parasitismo, sem surgimento de grandes lesões como erosões ou úlceras na mucosa intestinal. De fato, os grupos dos animais naturalmente infectados mostraram a presença formas amastigotas de *Leishmania*, particularmente dentro de macrófagos na lamina própria dos segmentos estudados independente da forma clínica que estes animais apresentavam e sem causar danos marcantes ao tecido (Figura 4).

Foram avaliados 96 segmentos do TGI dos cães infectados (n =12). 38 segmentos apresentaram um aumento discreto e difuso da celularidade inflamatória. 27 segmentos apresentaram um aumento de celularidadeinflamatória moderado e difuso por toda a lâmina própria. Segmentos que apresentaram um aumento intenso e difuso da celularidade inflamatória somam 28. 25 segmentos apresentaram infiltração celular entre camadas

histológicas, em 17 segmentos foram visualizadas infiltrações celulares dos folículos linfoides extravasando pela muscular da mucosa e atingindo a lâmina própria como mostra o Gráfico 2 e a Figura 4.

**Gráfico 2: Avaliação das alterações histopatológicas nos cães infectados com *Leishmania (L.) infatum* do grupo sintomático (n=6) e assintomático (n=6)**



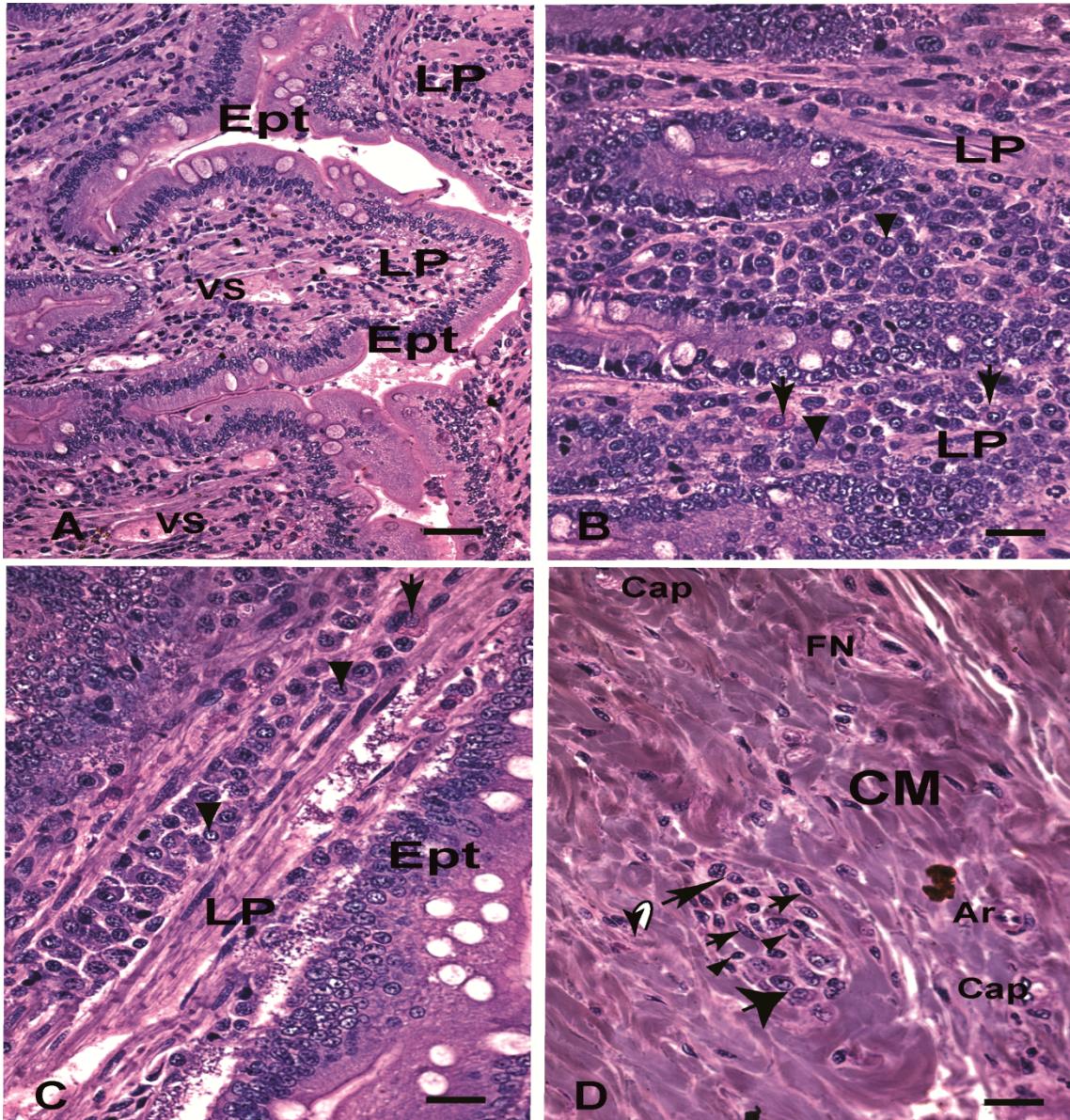


Figura 3 (A-D): Corte Histológico de Fragmentos de Intestino Delgado (Duodeno) Incluídos em Glicol Metacrilato (GMA) de Cão Naturalmente Infectado com *Leishmania (L) infantum* Sintomático: (A) Microfotografia panorâmica mostrando epitélio glandular íntegro. Notar intensa celularidade da lamina própria evidenciada pelos núcleos celulares corados pela Hematoxilina. Barra = 32 $\mu$ m; (B-D) Detalhes da figura anterior mostrando presença de células mononucleares distribuídas difusamente na lamina própria. Em (B) notar intensa presença de plasmócitos com morfologias peculiares: alguns com citoplasma acidófilo caracterizando células em degeneração hialina (corpúsculo de Russel) (setas) e outras com formação de vacúolos intracitoplasmáticos que histologicamente sugerem a dilatação do complexo de Golgi (cabeças de seta). Em (C), no centro da figura, observar plasmócitos com citoplasma basofílico dispostos em fileira na lamina própria. Também há plasmócitos em degeneração hialina (corpúsculo de Russel) (seta) e outros com formação de vacúolos intracitoplasmáticos (cabeças de seta) Em (D) formação de um granuloma na camada muscular constituído por células epitelióides (setas grossas), macrófagos (seta fina), plasmócitos (seta larga) e pequenos linfócitos (cabeças de seta); Hematoxilina-Eosina (H&E). Barras = 16 $\mu$ m. Ept: Epitélio; LP: Lamina Própria; MM: Muscular da Mucosa; CM: Camada Muscular; Cap: Capilar; Ar: Arteríola; FN: Feixe Nervoso; VS: Vaso Sanguíneo.

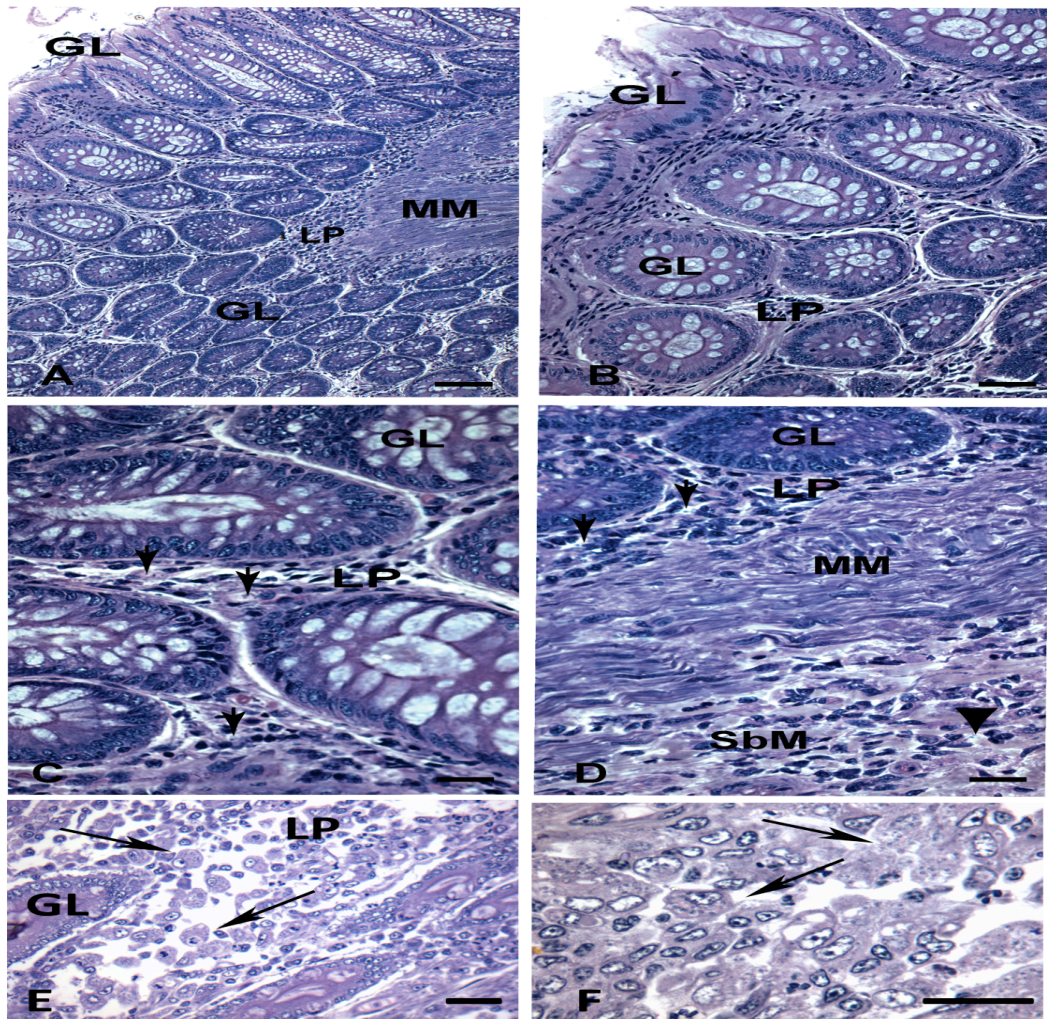
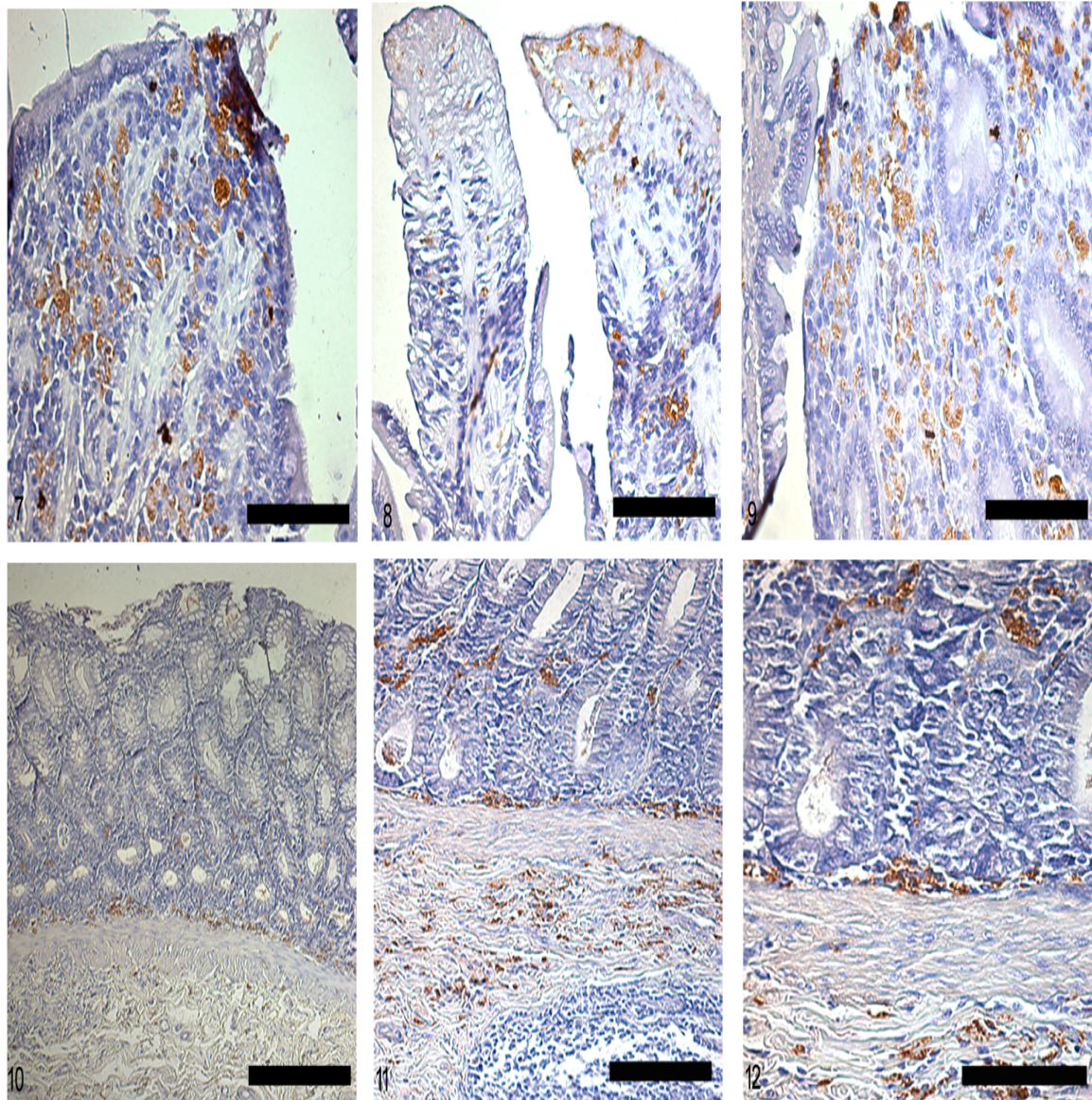


Figura 4 (A-F): Fragmentos de Intestino Grosso (C6lon) (A-D) E Intestino Delgado (E-F) Incluidos em glicolmetacrilato (GMA) de C6o Naturalmente Infectado com *Leishmania infantum* Sintom6tico: (A) Microfotografia panor6mica mostrando as camadas mucosa (epit6lio glandular integro) e muscular da mucosa. Notar celularidade da lamina pr6pria. Barra = 64 $\mu$ m; (B) Figura anterior em maior aumento mostrando presen7a de c6lulas mononucleares distribu6das difusamente na lamina pr6pria. (C-D). Detalhes da figura anterior mostrando presen7a de formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macr6fagos na lamina pr6pria (seta). Em (D) notar a presen7a de formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macr6fagos na submucosa (cabe7a de seta). Barra = 16 $\mu$ m. (E) observar presen7a de macr6fagos parasitados distribu6dos pela lamina pr6pria. Barra = 16 $\mu$ m. (F) observar presen7a de formas amastigotas vacuolizadas dentro do citoplasma de macr6fagos na lamina pr6pria (setas). Hematoxilina-Eosina (H&E). Barra = 8 $\mu$ m GL: Gl6ndula de Lieberk6uhn com presen7a de c6lulas caliciformes; LP: Lamina Pr6pria; MM: Muscular da Mucosa; SbM: Submucosa.

#### **4.4 Avaliação qualitativa pela imuno-histoquímica em tecidos incluídos em parafina:**

A marcação imuno-histoquímica mostrou resultados satisfatórios quando utilizada em todo o TGI em tecidos incluídos em parafina. Durante a avaliação observou-se que as regiões de marcação positiva, apresentaram formas amastigotas facilmente localizáveis na lâmina própria e submucosa do TGI. Na avaliação qualitativa dos grupos infectados, 10 cães (83,33%) apresentaram parasitismo intenso, de fácil visualização pela marcação imuno-histoquímica sendo que destes foi encontrado em maior proporção, marcações no intestino grosso e são as regiões que normalmente foram encontrados macrófagos parasitados. Em 6 animais também foram encontradas marcações evidentes em intestino delgado e um animal marcações evidentes encontrada no estômago.

Das marcações encontradas em intestino grosso, 88,8% das formas amastigotas foram encontradas em maior proporção subjacentes a muscular da mucosa, na base da lâmina própria. Entretanto, das marcações positivas localizadas nas porções anteriores do TGI (estômago, duodeno e íleo) 100% das formas amastigotas foram encontradas próximas ao lúmen intestinal, dentro das vilosidades logo abaixo do epitélio intestinal como descrito e ilustrado na figura 5 e Tabela 1:



**Figura 5** Duodeno (7, 8 e 9) e cólon (10, 11 e 12) de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* (reação estreptoavidinaperoxidase). (7-9) lâmina própria do duodeno; notar amastigotas distribuídas pelo todo o tecido. Barra= 32 $\mu$ m. (10-12)Lâmina propria de cólon; notar amastigotas concentradas perto da muscular da mucosa distante do lúmen. Barra= 64  $\mu$ m, 32  $\mu$ m e 16  $\mu$ m reação estreptoavidinaperoxidase.

**Tabela 1. Distribuição de marcações positivas de amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* pela imuno-histoquímica em trato gastrointestinal dos cães infectados com *Leishmania infantum* (n=12):**

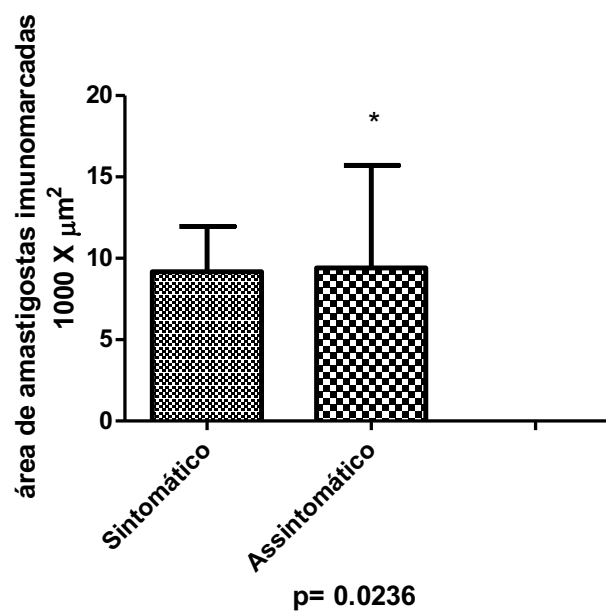
Distribuição	Estômago	Intestino Delgado			Intestino Grosso		
		Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Cólon	Reto
PL	+	+++	S	++	S	S	+
PM	S	S	S	S	+++	+++	++

- PL amastigotas distribuídas próximas ao lúmen intestinal
- PM amastigotas distribuídas próximas a muscular da mucosa
- S ausência de parasitismo
- + discreto parasitismo
- ++ moderado parasitismo
- +++ intenso parasitismo

#### 4.5 Avaliação quantitativa pela imuno-histoquímica em tecidos incluídos em parafina:

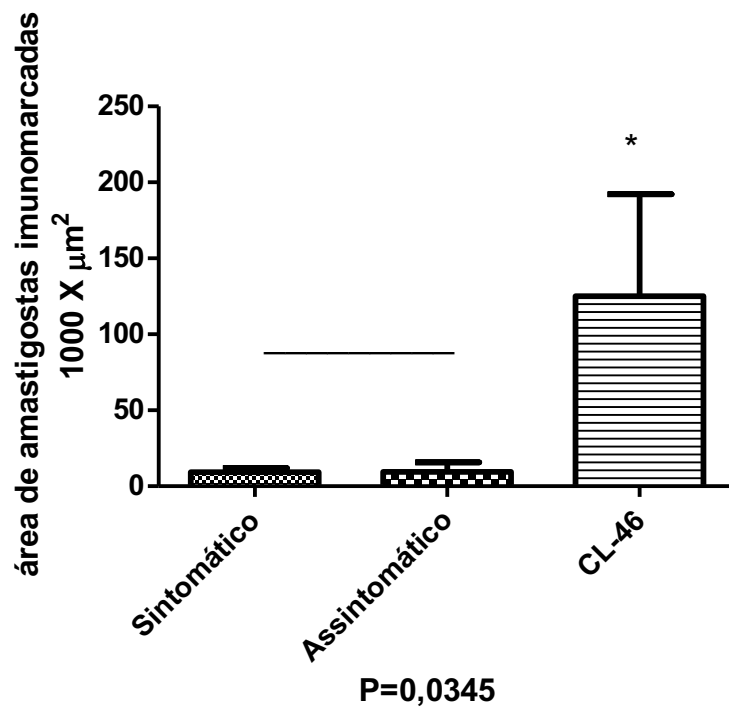
Todos os cães dos grupos infectados apresentaram parasitismo em segmentos do TGI (Gráfico 3) com exceção do esôfago e jejuno, que não apresentaram parasitismo. As regiões mais parasitadas foram duodeno nos grupos assintomático seguido pelo ceco, no grupo sintomático. Cólon, reto, íleo e estômago também apresentaram marcações positivas.

**Gráfico 3 Parasitismo tecidual pela técnica da estreptoavidina-peroxidase em todos os segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (n=12).**



Foi constatado que um dos cães do grupo assintomático (animal: CL-46) possuía um parasitismo bastante elevado o que estaria interferindo diretamente no desvio padrão da amostragem. Quando analisamos este cão separadamente, foi possível observar que o parasitismo presente no TGI era maior que a soma de ambos os grupos (Gráfico 4).

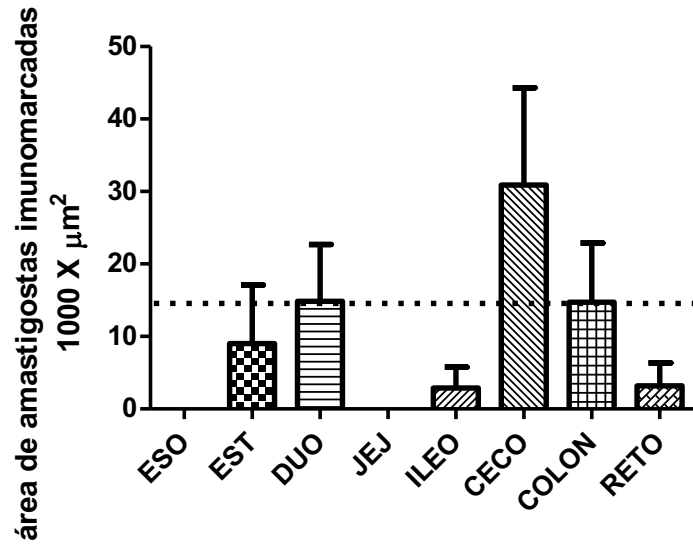
**Gráfico 4:** Parasitismo tecidual pela técnica da estreptoavidina-peroxidase em todos os segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* dos grupos sintomáticos (n=6), assintomáticos (n=5) e CL-46.

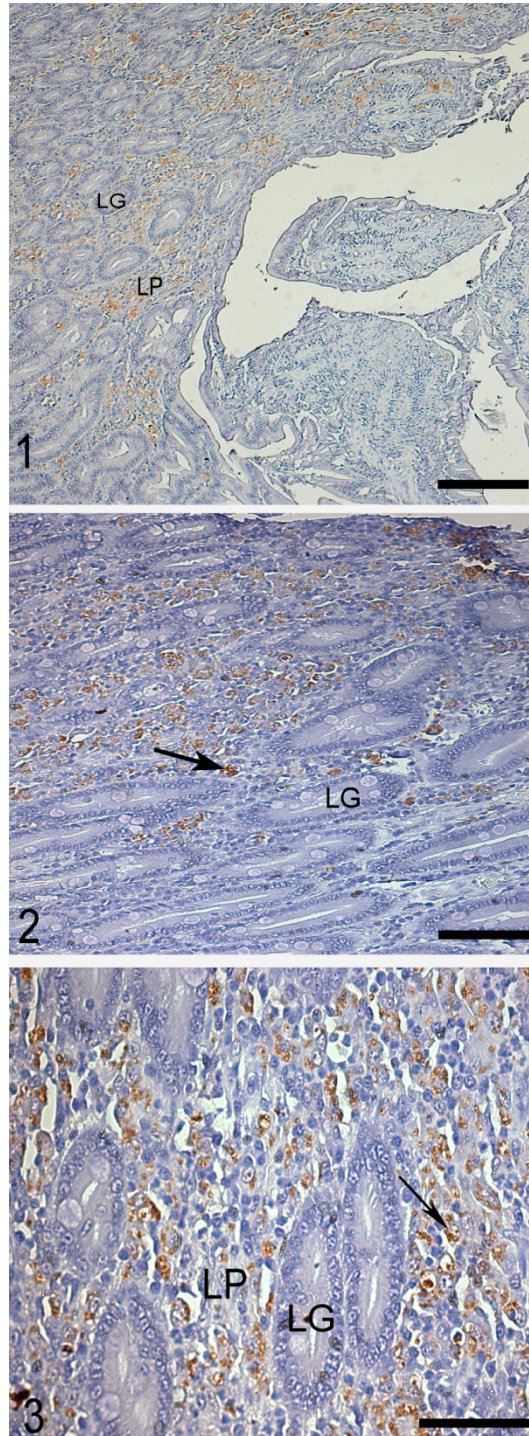


No grupo sintomático a região de maior carga parasitária foi o ceco, seguida pelo duodeno, cólon, estômago, reto e íleo (Gráfico 5).



Grafico5:Parasitismo tecidual pela técnica da estreptoavidina-peroxidase em todos os segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* do grupos sintomáticos (n=6).

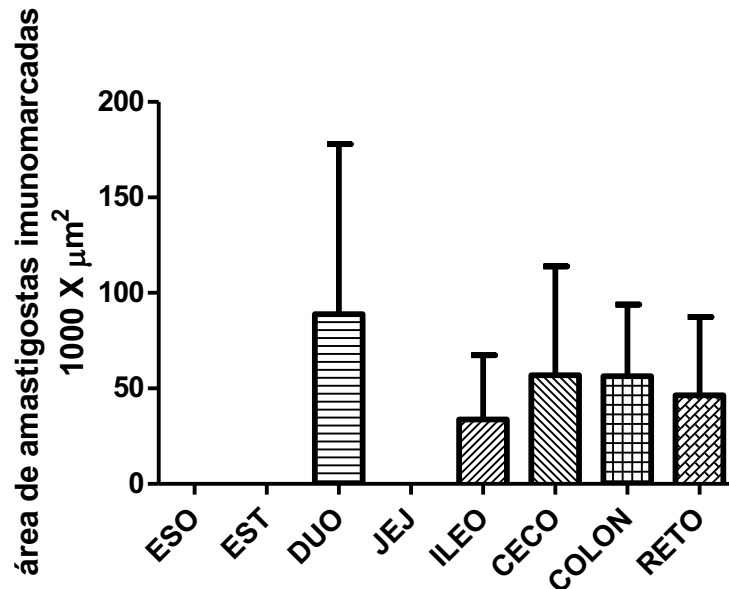




**Figura 6: Duodeno de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum*: amastigotas visualizadas por imunomarcação. (A) Mucosa duodenal com amastigotas distribuídos por todo o tecido, Bar = 64 $\mu$ m. (B) amastigotas difusamente distribuídas (seta) Bar = 32 $\mu$ m; (C) intensa marcação de amastigotas distribuídos por todo lâmina própria (seta) Bar = 16 $\mu$ m. LG: glândula de *Liebkühn* com células caliciformes; LP: lâmina própria; reação estreptoavidina-peroxidase contra corados com Hematoxilina de Harris;**

Os cães do grupo assintomáticos apresentaram maior carga parasitária em duodeno seguidas de ceco, cólon reto e íleo (Gráfico 6).

**Gráfico6:** Parasitismo tecidual pela técnica da estreptoavidina-peroxidase em todos os segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* do grupos assintomáticos (n=6).



#### 4.6 Avaliação da imuno-histoquímica em tecidos incluídos em glicolmetacrilato em comparação com tecidos incluídos em parafina:

Tecidos de cães incluídos em resina de glicolmetacrilato não apresentaram resultados satisfatórios nas marcações de formas amastigotas de *Leishmania* pela reação da estreptoavidina-peroxidase, apesar do tempo de execução da técnica ser bem menor do que o realizado em parafina. As marcações se mostraram inferiores em aspectos de intensidade e coloração quando comparadas com os tecidos incluídos em parafina além de não marcarem regiões sabidamente parasitadas no tecido. É possível identificar formas amastigotas de *Leishmania* marcadas e não marcadas no mesmo tecido (Figura 7).

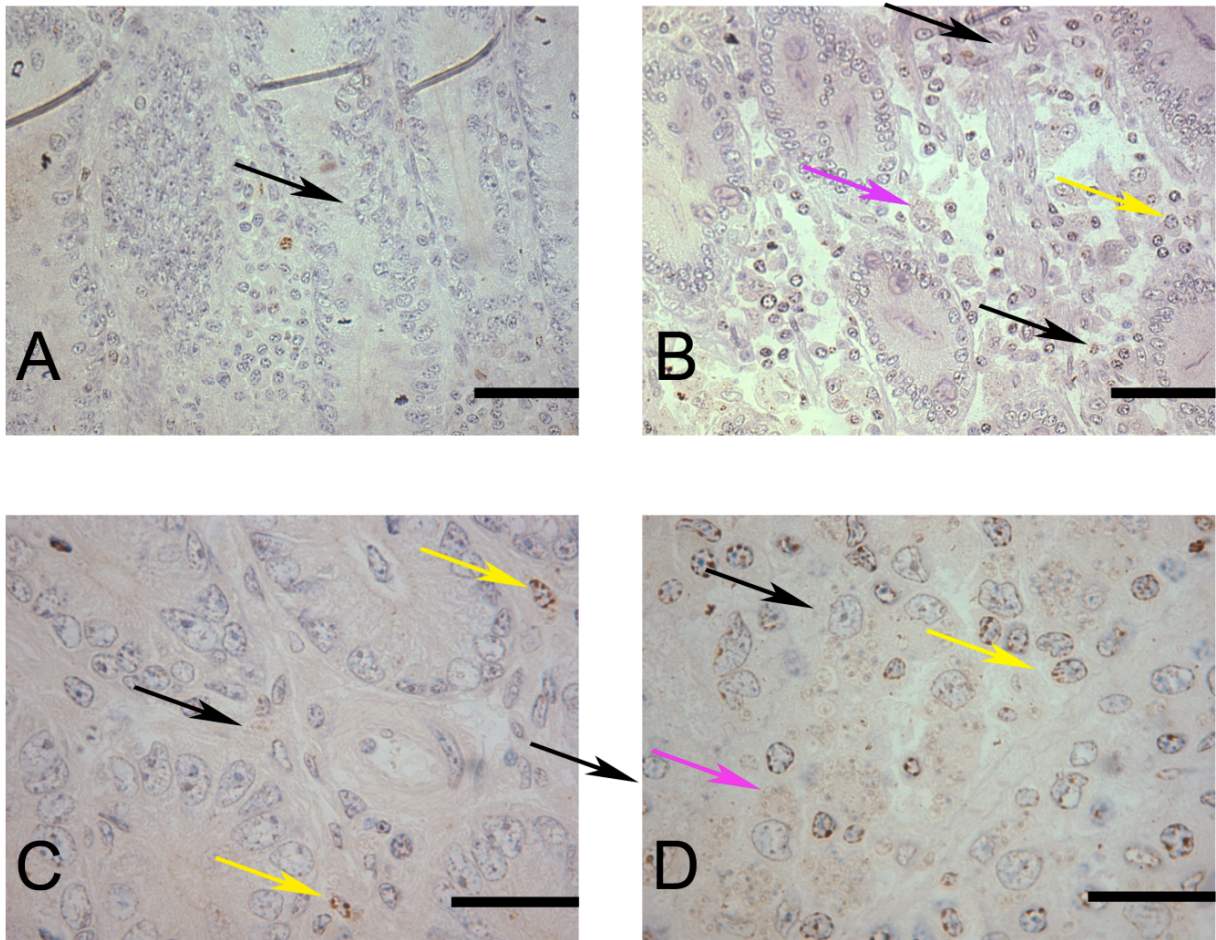


Figura 7: Intestino delgado de cão naturalmente infectado com *Leishmania (L.) infantum* (A-D). Em (A) identificar marcações positivas (setas pretas) para formas amastigotas de *Leishmania* sp. em lamina própria de duodeno de cão naturalmente infectado. (Barra=16 $\mu$ m, reação estreptoavidina peroxidase espessura 2 $\mu$ m). Em (B) observar marcação positiva (setas pretas) para formas amastigotas de *Leishmania* sp. e marcações inespecíficas em núcleo celular (seta amarela) e formas amastigotas não marcadas (seta rosa). (Barra=16 $\mu$ m, reação estreptoavidina peroxidase espessura 2 $\mu$ m) Em (C) identificar marcações positivas de baixa intensidade (seta preta) e marcações inespecíficas (setas amarelas) presentes na lâmina própria (Barra=8 $\mu$ m, reação estreptoavidina peroxidase espessura 2 $\mu$ m). Em (D) observar marcações positivas intracelular (setas pretas) marcações nucleares inespecíficas (seta amarela) e formas amastigotas não marcadas (seta rosa) Barra=8 $\mu$ m, reação estreptoavidina peroxidase espessura 2 $\mu$ m)

#### **4.7 Avaliação dos tecidos incluídos em glicolmetacrilato em comparação com tecidos incluídos em parafina usando as colorações de rotina e especiais:**

A técnica de inclusão de tecido canino em metacrilato mostrou-se de grande importância para as avaliações do experimento, apresentando um melhor resultado para as avaliações morfológicas, histopatológicas e morfométricas quando utilizadas colorações rotineiras e especiais de histologia em comparação com a inclusão de tecidos em parafina. Colorações como H&E, azul de toluidina, Dominici, PAS mostraram-se de qualidade superiores quando comparado com as mesmas colorações em tecidos incluídos em parafina (Figura 8). Com metacrilato, em todas as colorações especiais (azul de toluidina, Dominici, PAS, prata amoniacal) foi possível identificar com facilidade as diferentes estruturas como células do parênquima tecidual, fibroblastos, tecido conjuntivo, células inflamatórias plasmócitos, linfócitos, macrófagos, granulócitos, mastócitos, muco, epitélio, arquitetura tecidual do órgão entre outros. A preservação do limite citoplasmático das células bem como as formas amastigotas de *Leishmania*, foi visualizada bem como a excelente morfologia do tecido em qualquer uma das colorações utilizadas neste experimento. A coloração em comparação com tecidos parafinados é mais rápida e prática de se realizar, pois não é necessário realizar desidratação/hidratação. No que diz respeito ao processamento, obtivemos melhores resultados em todas as marcações quando utilizamos Carnoy's como fixador de tecidos sendo todos os tecidos mantidos no fixador pelo tempo limite de 3 horas sob refrigeração (4°C). Amostras fixadas em formol tamponado 10%, não foram consideradas melhores quando comparadas a este fixador.

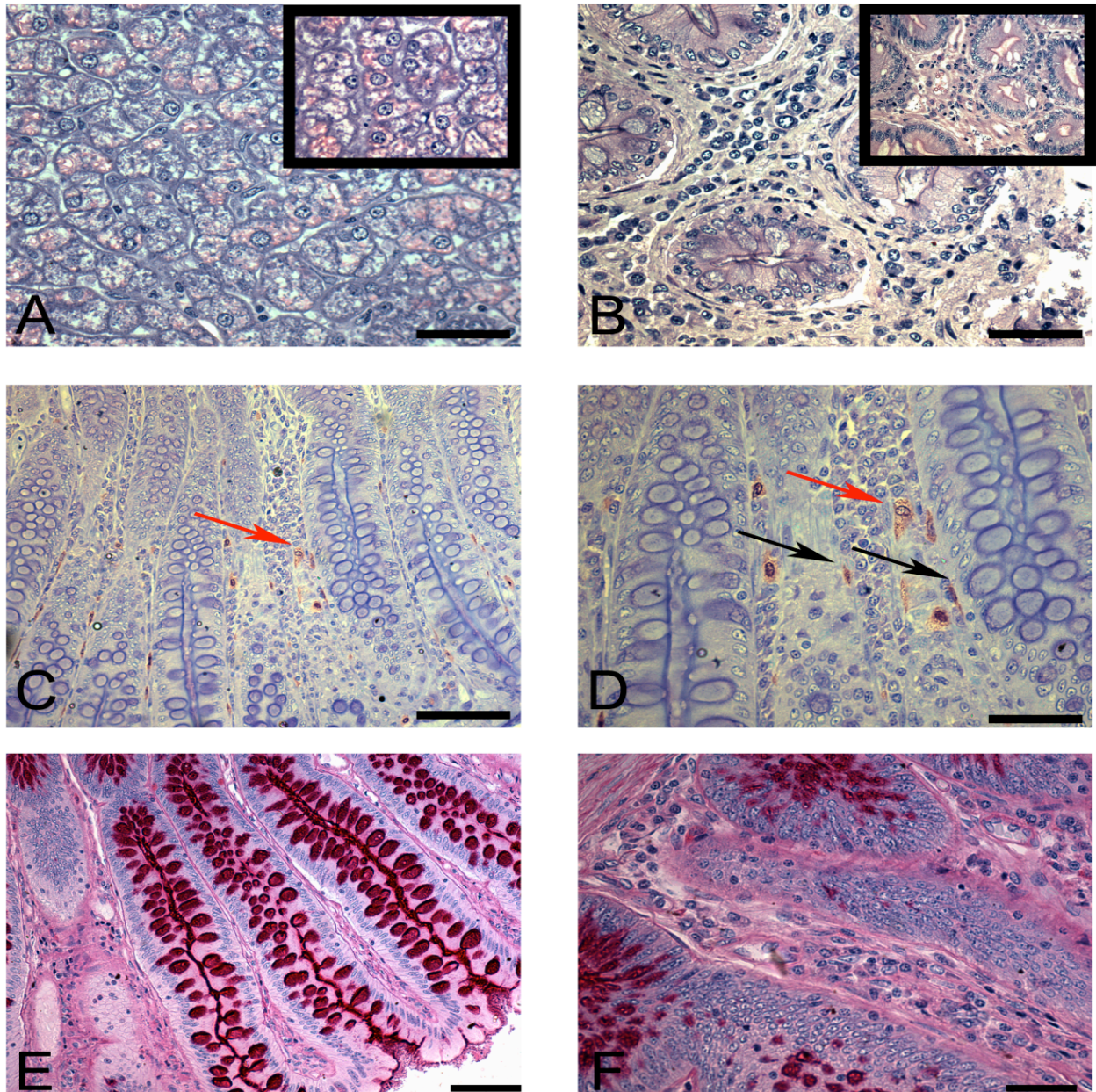


Figura 8: Tecido canino incluído em resina de glicolmetacrilato cortado a  $3\mu\text{m}$ . Em (A) fotomicrografia de fígado de cão corado em hematoxilina-eosina: notar hepatócitos com preservação dos limites citoplasmáticos evidentes e a visualização nuclear (detalhe) (Barra  $16\mu\text{m}$  hematoxilina-eosina). Em (B) fotomicrografia de intestino grosso (cólon) de cão corado em hematoxilina-eosina: notar as células, lamina própria e epitélio intestinal íntegro. Visualizar (detalhe) hemácia presentes dentro de vasos (Barra  $16\mu\text{m}$  hematoxilina-eosina). Em (C) fotomicrografia de região de íleo de cão. Observar mastócitos corados (seta vermelha) e a preservação da morfologia celular mesmo em fundo azulado. (Barra  $32\mu\text{m}$  azul de toluidina) Em (D) em maior aumento da figura (C) mastócitos bem evidentes corados em vermelho (seta vermelha) sendo possível sua identificação mesmo após a degranulação (setas pretas) (Barra  $16\mu\text{m}$  azul de toluidina). Em (E) observar em menor aumento e em maior aumento (F) coloração de PAS com muco intestinal corado em vermelho. (Barra =  $32\mu\text{m}$  e  $16\mu\text{m}$  PAS)

#### 4.8 Avaliação morfométrica do TGI:

A avaliação morfométrica do TGI foi feita em todos os segmentos com exceção do esôfago uma vez que no mesmo não foram visualizadas formas amastigotas de *Leishmania* e não foram identificadas áreas de inflamação sugestiva de infecção ou envolvimento do órgão na doença.

#### 4.9 Avaliação morfométrica do epitélio do TGI:

A avaliação morfométrica do epitélio intestinal foi feita comparando-se as regiões de todos os segmentos em cada grupo. A fim de se estabelecer um padrão, a área morfométrica do grupo controle não apresentou diferença quando comparado todos os segmentos entre si (Gráfico 7). Entretanto quando avaliado o grupo de cães sintomático houve diferença entre regiões do mesmo grupo (Gráfico 8). Quando avaliado o grupo assintomático não houve diferença entre os segmentos do grupo (Gráfico 9).

Gráfico 7: Área de epitélio do Trato Gastrointestinal de cães do grupo controle (n=5)

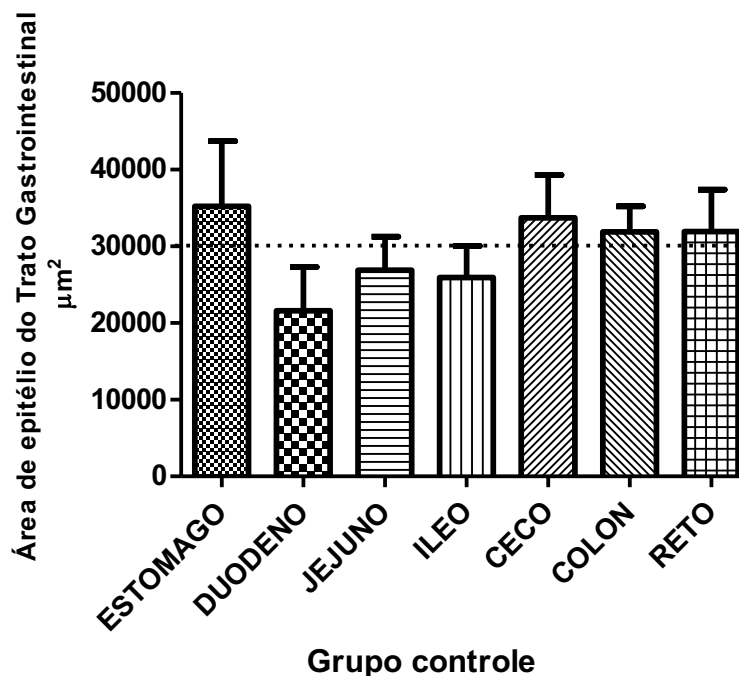
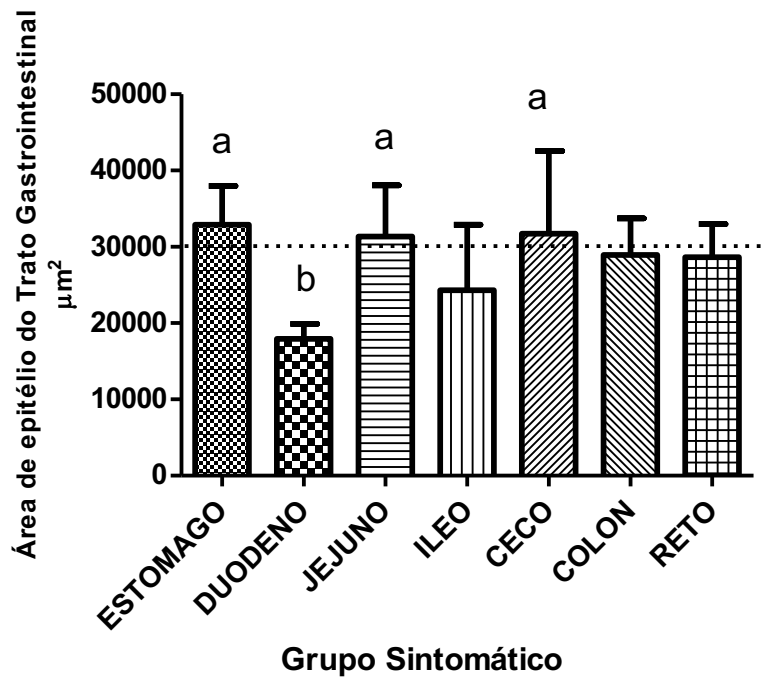
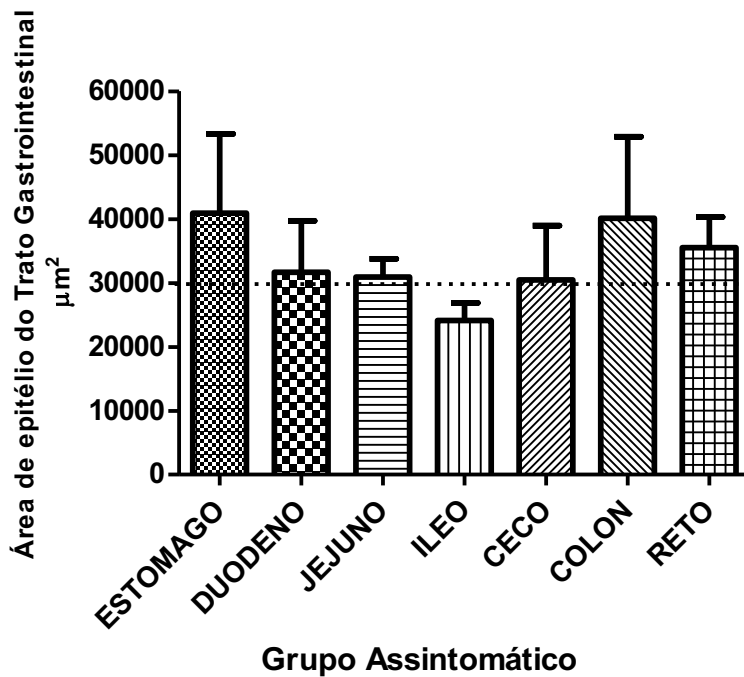


Gráfico 8: Área de epitélio do Trato Gastrointestinal de cães do grupo Sintomático (n=6)



$p = 0.0053$

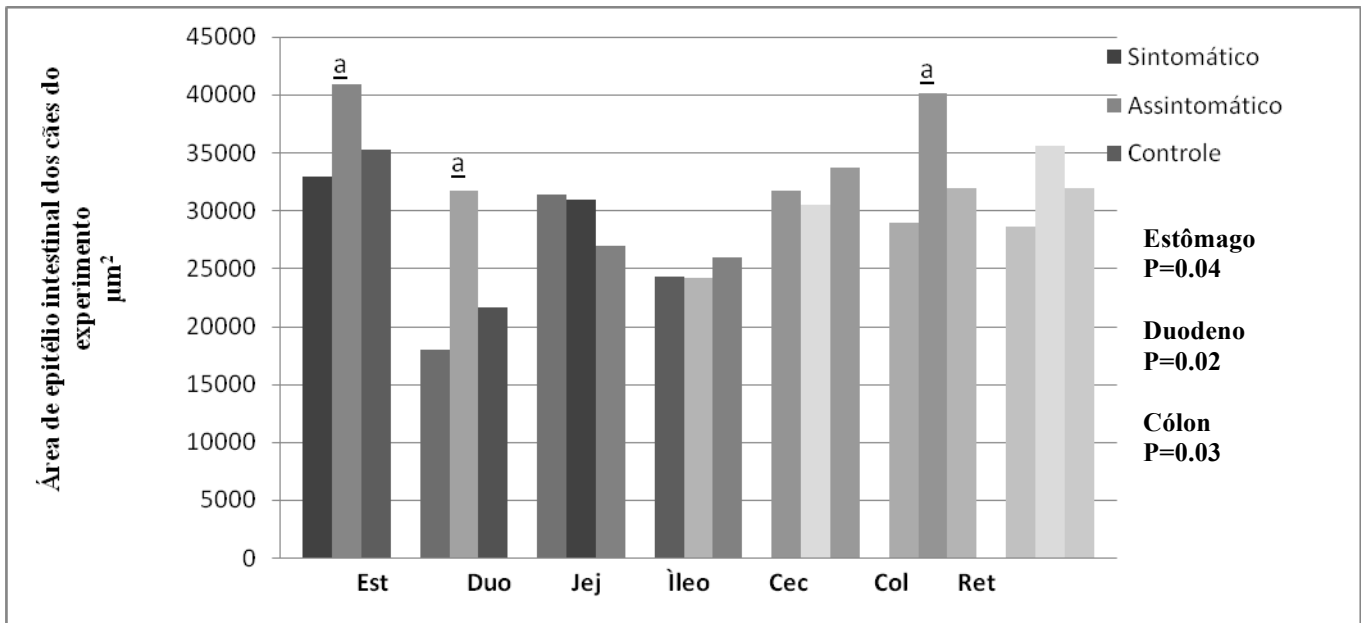
Gráfico 9: Área de epitélio do Trato Gastrointestinal de cães do grupo Assintomático (n=6)





Quando foi analisada a área de epitélio de todos os segmentos dos três grupos, foi observada diferença entre o grupo assintomático e o grupo sintomático (Gráfico 10).

**Gráfico 10: Avaliação da área de epitélio do TGI dos cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (n=12) e grupo controle (n=5):**

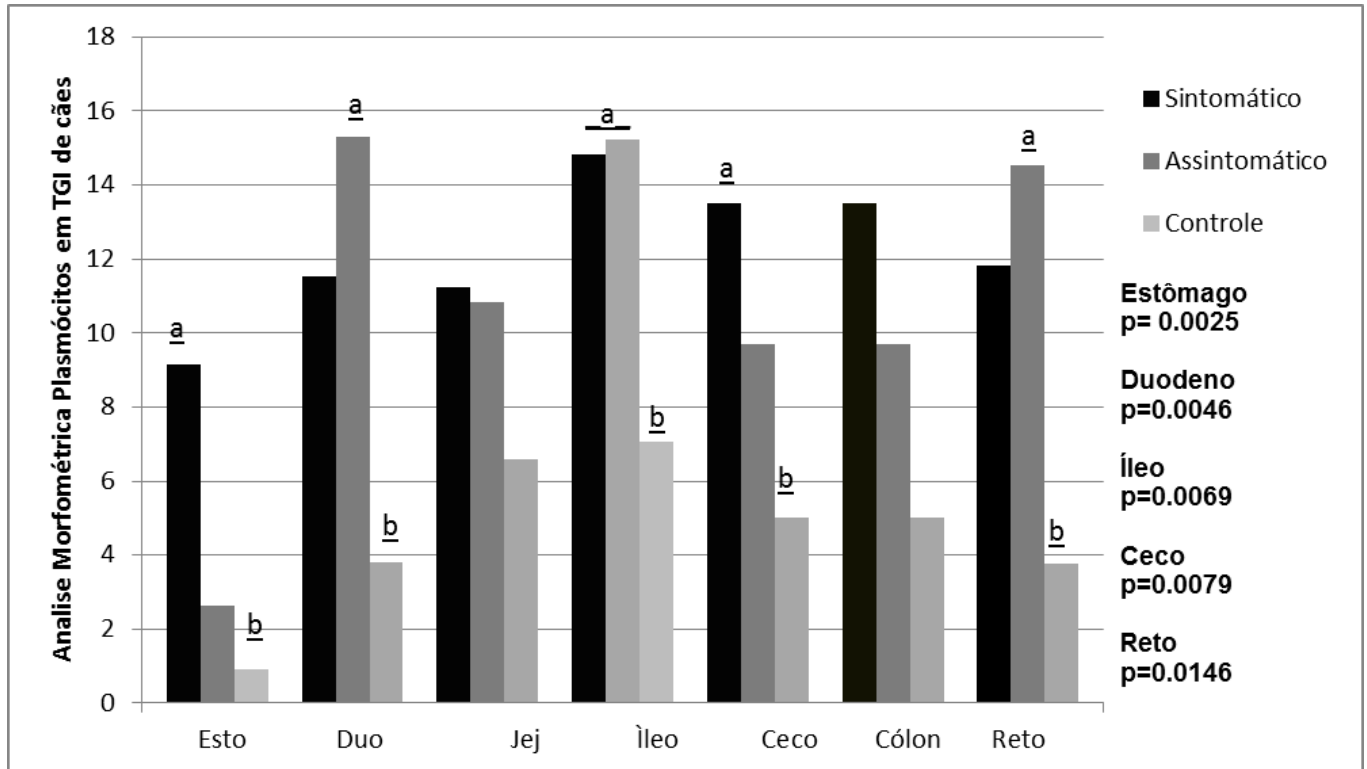


#### 4.10 Avaliação morfométrica das células inflamatórias:

##### 4.10.1 Avaliação morfométrica dos Plasmócitos do TGI:

A quantidade de plasmócitos avaliados foi maior nos grupos infectados em comparação com o grupo controle (Gráfico 11). Houve diferença entre as regiões principalmente aquelas onde foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania*.

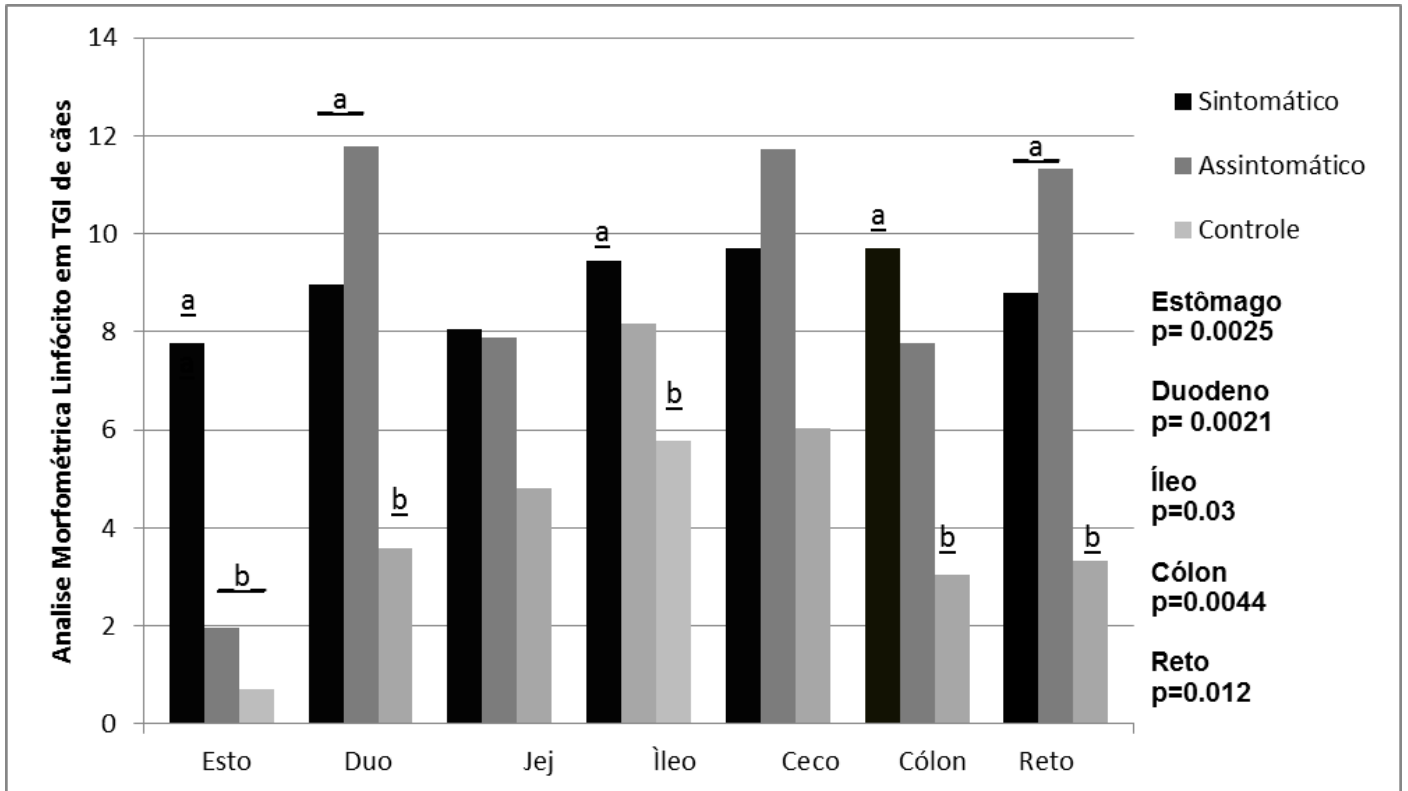
**Gráfico 11: Avaliação morfológica de plasmócitos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (n=12) e cães não infectados (n=5).**



#### 4.10.2 Avaliação morfológica dos linfócitos do TGI:

A avaliação dos linfócitos demonstrou aumento do número de linfócitos do grupo infectado em relação ao grupo controle. A diferença foi semelhante a encontrada na avaliação dos plasmócitos sendo as regiões onde foram visualizadas formas amastigotas de *Leishmania* as de maior número deste tipo celular (Gráfico 12).

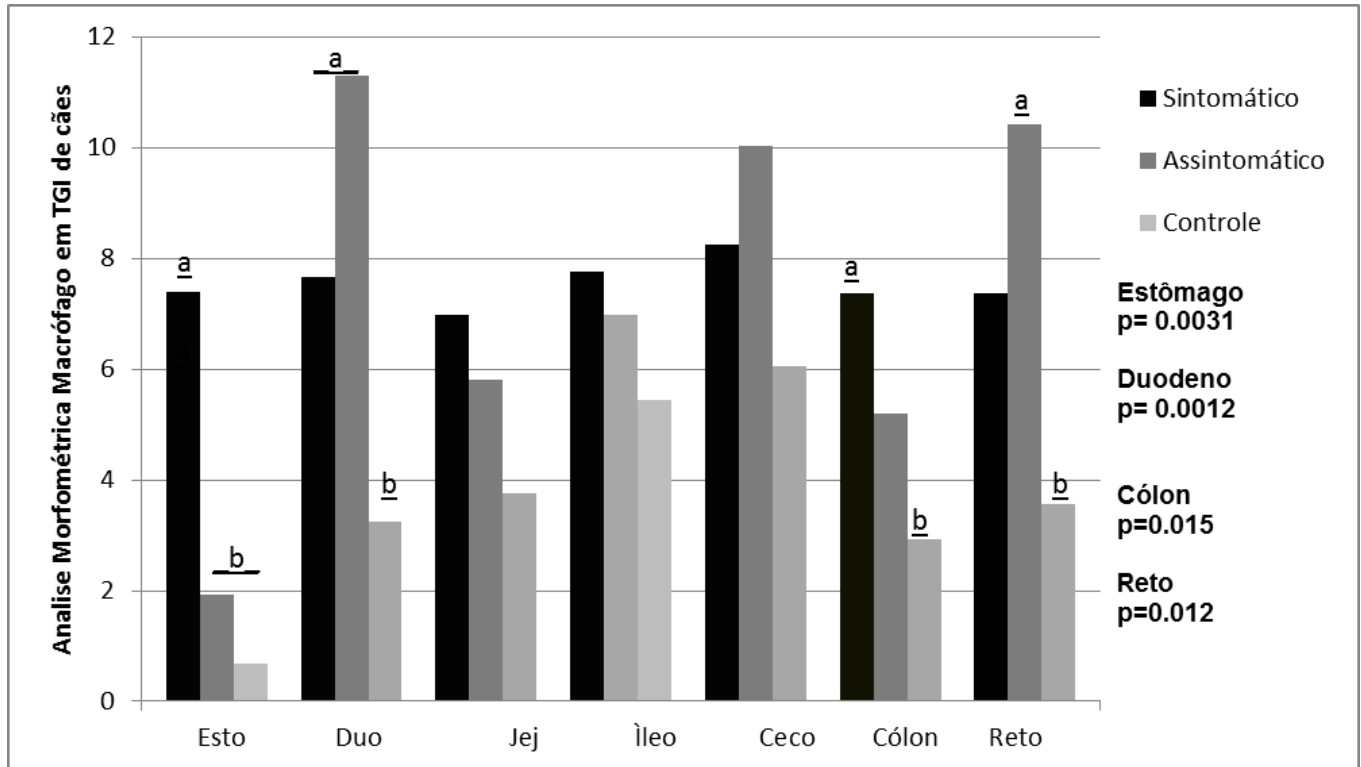
**Gráfico 12: Avaliação morfométrica de linfócitos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (n=12) e cães não infectados (n=5).**



#### 4.10.3 Avaliação morfométrica dos Macrófagos do TGI

A avaliação dos macrófagos demonstrou aumento do número de destas células do grupo infectado em relação ao grupo controle. A diferença estatística, foi semelhante a encontrada na avaliação dos plasmócitos sendo as regiões onde foram visualizadas formas amastigotas de *Leishmania* as de maior número deste tipo celular (Gráfico 13).

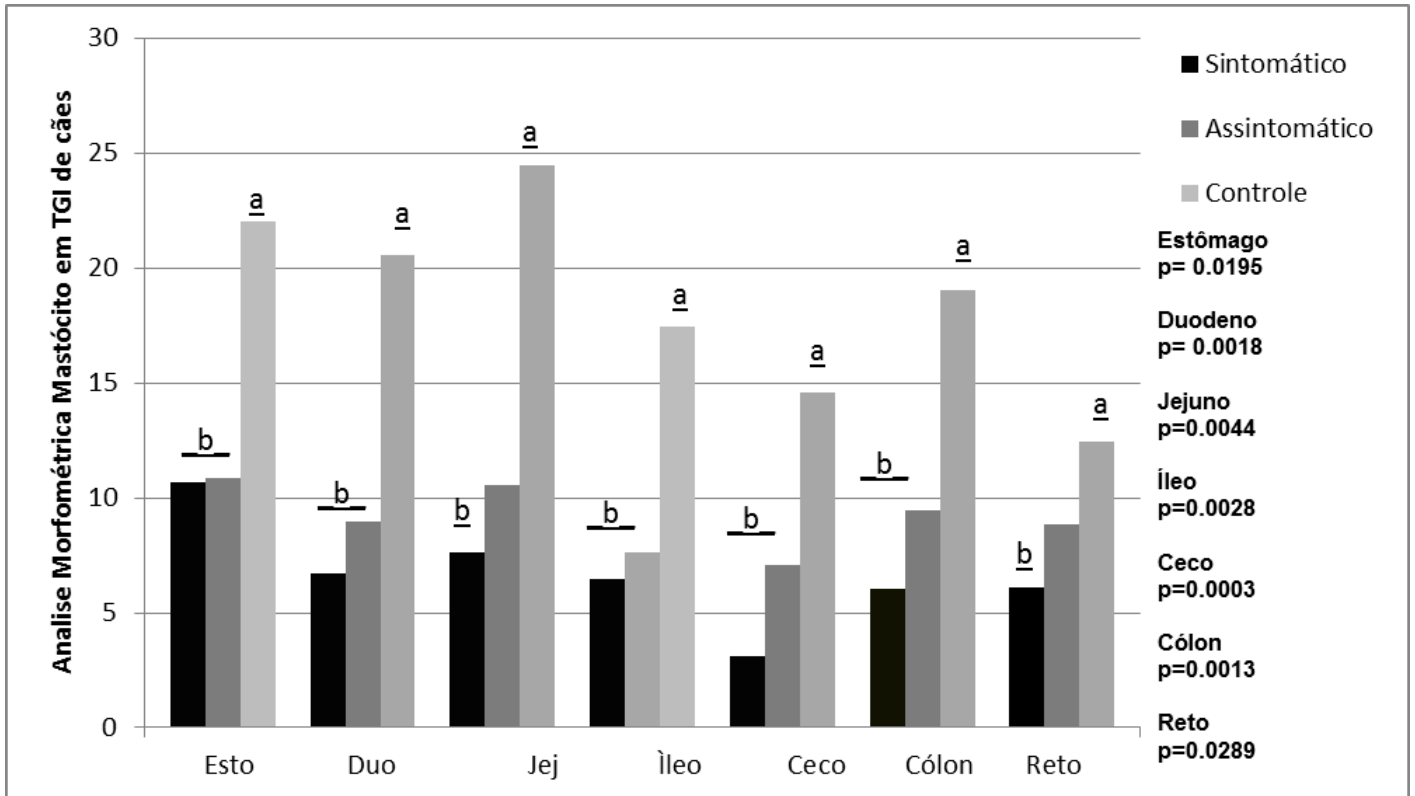
**Gráfico 13: Avaliação morfométrica de Macrófagos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (n=12) e cães não infectados (n=5).**

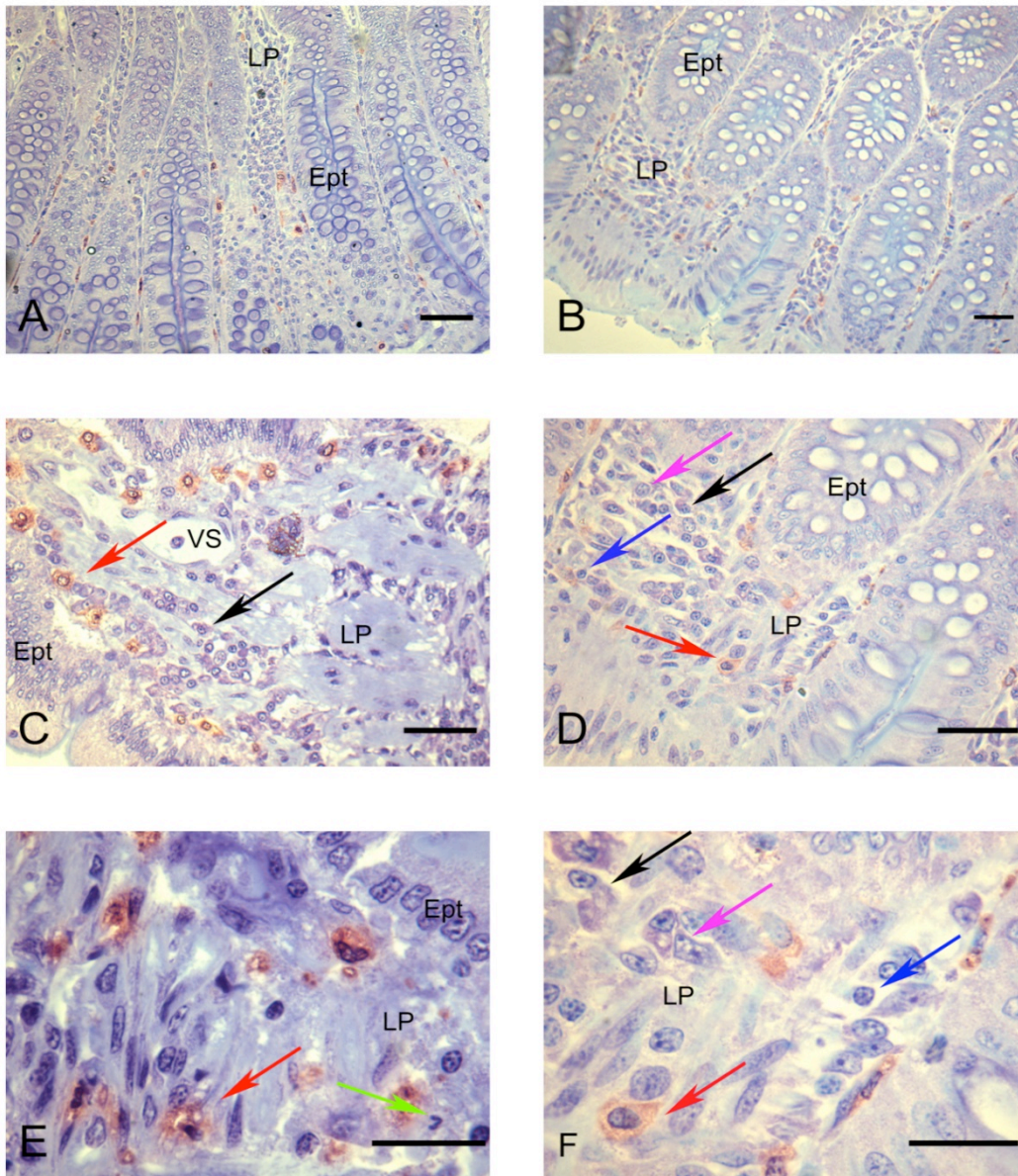


#### 4.10.4 Avaliação morfométrica dos Mastócitos no TGI:

A avaliação dos mastócitos demonstrou uma redução no número de células dos grupos infectados em relação ao grupo controle em todos os segmentos. Cães infectados com *Leishmania* apresentaram um número menor destas células em todos os segmentos do TGI quando comparados ao grupo controle (Gráfico 14) (Figura 9).

**Gráfico 14: Avaliação morfológica de mastócitos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (n=12) e cães não infectados (n=5).**



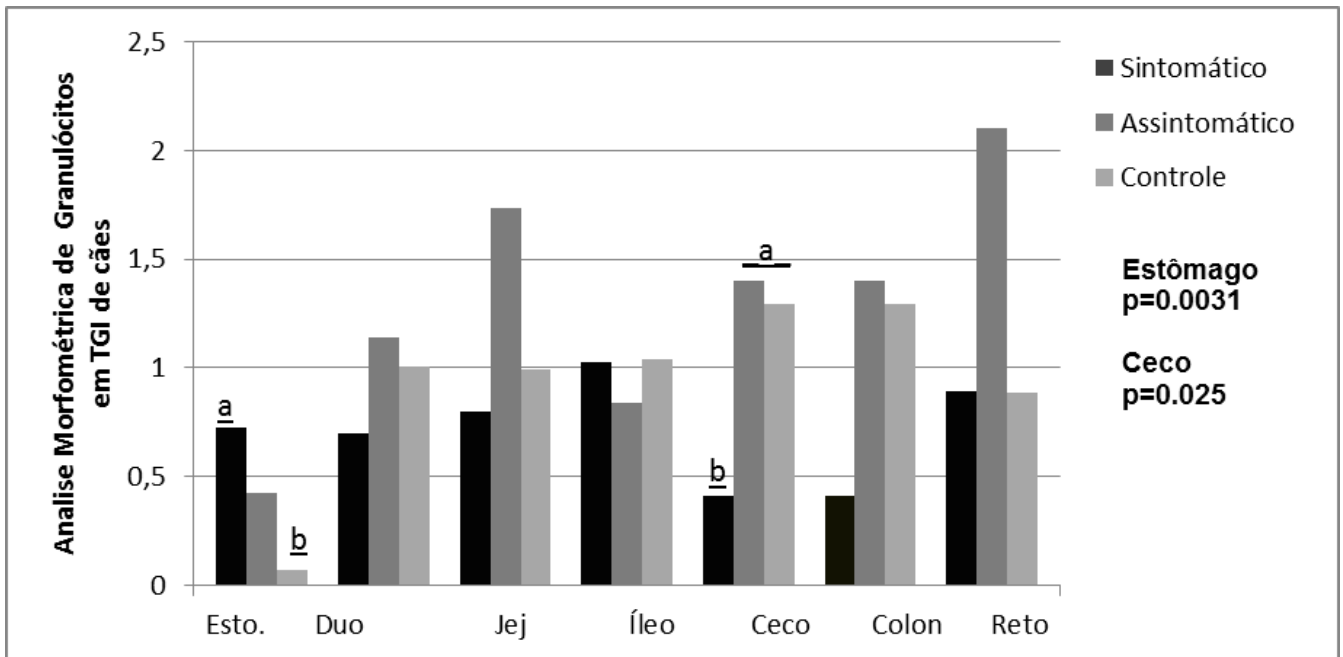


**Figura 9:** Fotomicrografia de Intestino Grosso de Cão Naturalmente infectado por *Leishmania infantum* Assintomático (B, D e F) e cão controle (A, C e E). Em (A) observar lamina propria (LP) contendo algumas células mononucleares, Epitélio intestinal (Ept) íntegro e mastócitos corados em vermelho. Em (B) observar em lamina propria o aumento de células inflamatórias predominantemente mononucleares e mastócitos corado em vermelho (Barra =32 $\mu$ m). Em (C) observar em maior presença de mastócitos (seta vermelha) por toda região abaixo do epitélio e infiltrado perivascular (VS) predominantemente mononuclear com presença de plasmócitos (seta preta). Em (D) aumento do número de plasmócitos (seta preta) e presença de macrófagos (seta rosa), linfócitos (seta azul) e mastócitos (seta vermelha) (Barra=16  $\mu$ m). Em (E) aumento da imagem (C) mostrando mastócitos (seta vermelha) e neutrófilo (seta verde). Em (F) aumento de (D) visualiza-se mastócitos (seta vermelha), linfócitos (seta azul), macrófago (seta rosa) e plasmócitos (seta preta) (Barra= 8  $\mu$ m). Coloração de Azul de Toluidina, espessura 2  $\mu$ m.

#### 4.10.5 Avaliação dos Granulócitos no TGI:

A avaliação dos Granulócitos mostrou que cães apresentam poucas células polimorfonucleares em TGI quando comparada às células mononucleares. A presença deste tipo de células foi constante nos grupos infectados e controle (Gráfico 15).

**Gráfico 15: Avaliação morfométrica de Granulócitos na lamina própria de segmentos do TGI de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (n=12) e cães não infectados (n=5).**



#### 4.11 Avaliação morfométrica da Lâmina Própria em TGI:

Quando avaliado a lamina própria de cada grupo separadamente foi identificado que a região de duodeno e íleo tiveram um aumento da área de lamina propria nos grupos infectados (Gráfico 16, 17, 18). Na avaliação da lamina própria realizada com todos os segmentos dos grupos foi visualizado que a lamina própria de cães do grupo sintomático foi maior que dos grupos assintomáticos que foi maior que o grupo controle (Gráfico 19) em estômago, duodeno e íleo.

Gráfico 16: Área de lamina própria no TGI de cães infectados grupo Sintomático (n=6).

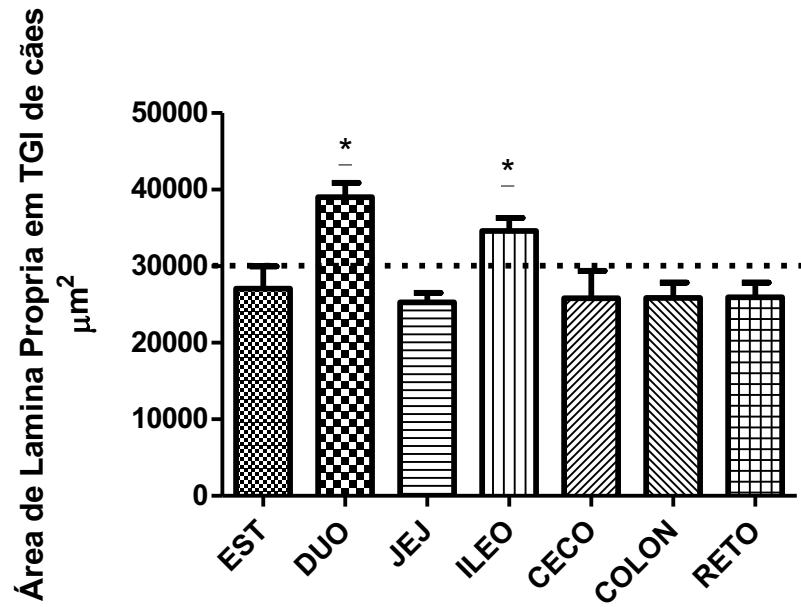


Gráfico 17: Área de lamina própria no TGI de cães infectados grupo Assintomático (n=6)

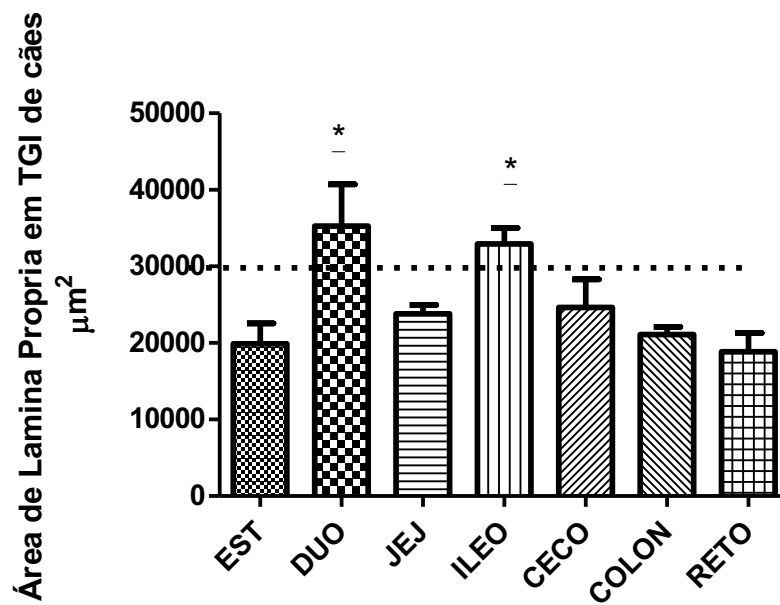




Gráfico 18: Área de lamina própria no TGI de cães grupo Controle (n=5)

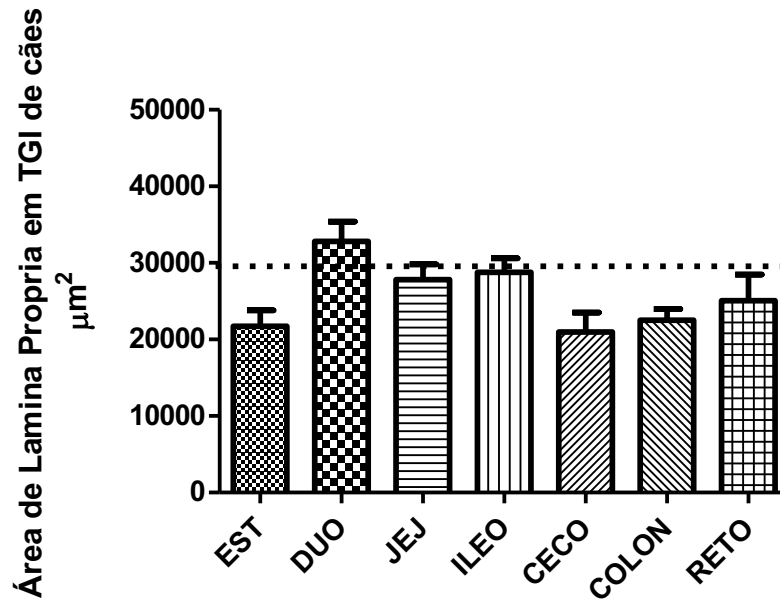
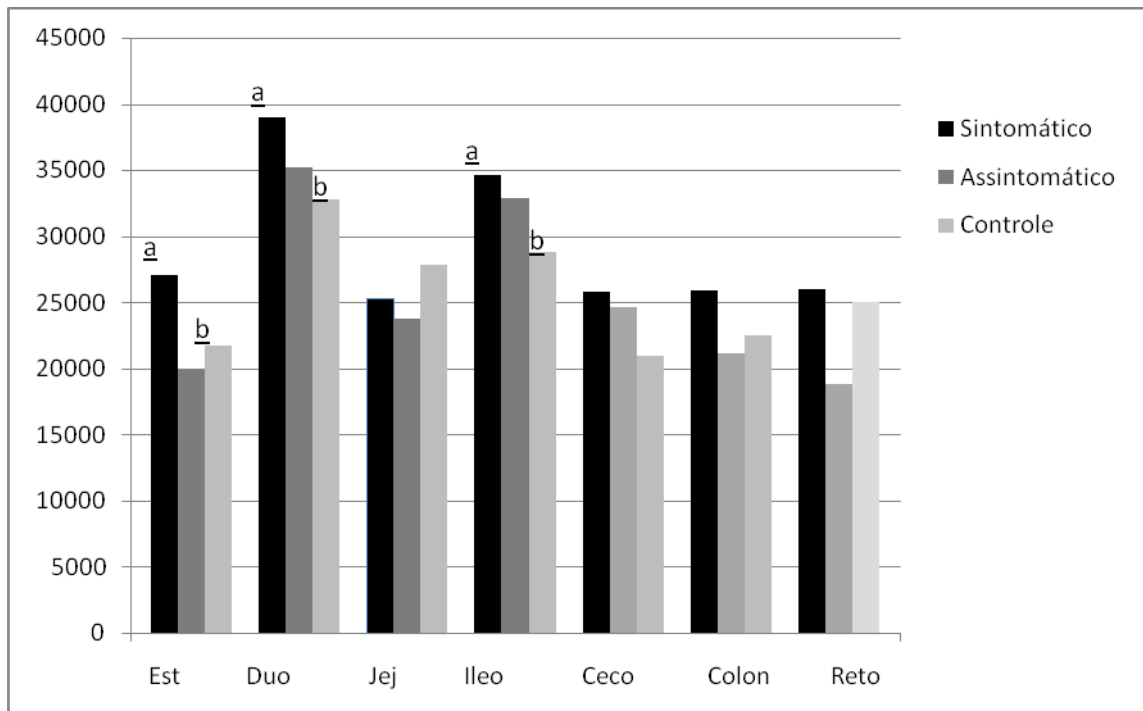


Gráfico 19: Área de lamina própria em cada segmento do TGI de cães infectados e grupo Controle (n=5)



## 5.0 Discussão

Os achados clínicos encontrados em nosso trabalho vão de encontro com os achados comumente encontrados na literatura. Solano-Galego et al. (2011), Toplu&Aydogan, (2011) descreveram que achados clínicos como lesões de pele, linfadenomegalia, progressiva perda de peso, atrofia muscular, esplenomegalia, lesões oculares, onicogribose vômitos e diarreia são encontrados na leishmaniose visceral canina. As lesões cutâneas como as dermatites não esfoliativas com ou sem prurido, dermatites erosivas, dermatites papulares, nodulares bem como onicogribose, são visualizadas em grande porcentagem de animais doentes. Em nosso grupo de pesquisa, observamos que as lesões dermatológicas, linfadenomegalia e onicogribose são achados comumente encontrados (Lima et al., 2007; Figueiredo et al. 2010). Neste estudo, as lesões de pele foram lesões encontradas em todos os cães do grupo sintomático.

A linfadenomegalia foi visualizada em metade dos cães em nossos estudos. Entretanto, Costa et al. (2008) relataram que a presença de lesões na pele possui relação direta com alterações encontradas em linfonodos. Os autores observaram que os cães que apresentavam lesões na pele da região da cabeça apresentavam maior parasitismo nos linfonodos parotídeos, os responsáveis pela drenagem da região, em comparação aos cães que não apresentavam lesões de pele da região. Os autores ainda afirmam que os linfonodos regionais e suas áreas de drenagem linfática; parotídeo, cervicais e submandibulares como os responsáveis pela drenagem das regiões de pina de orelha e nariz; região caudal da pele e subcutâneo da cabeça; região externa do nariz, lábios, bochechas, pálpebras, glândula lacrimal e músculos superficiais da cabeça respectivamente. Este achado corrobora o que Lima et al., (2007) encontraram em seus estudos, que do grupo de cães sintomáticos de duas regiões endêmicas para LVC apresentaram ulcerações na cabeça e linfadenomegalia em linfonodos axilares e cervicais.

Alterações oculares como as blefarites foram encontradas em nosso trabalho. De acordo com Alvar et al., (2004), as blefarites são alterações oculares comuns na LVC bem como uveítes, eritema palpebral, crostificação periocular e as conjuntivites. De Almeida Ferreira et al., (2012) foram além e mostraram que o exame moleculares usando um swab conjuntival em cães pode ser um método sensível e prático com resultados semelhantes quando comparados a amostras de aspirado de medula óssea, sendo considerado um método para diagnóstico de LVC. Em nosso experimento não foram observadas conjuntivites.

As alterações clínicas relacionadas ao TGI em ambos os cães naturalmente (Tryphonaset al., 1977; Ferrer et al., 1991; Toplu e Aydogan 2011) e experimentalmente infectados (González et al., 1990) já foram descritos, sendo a diarreia crônica de intestino grosso, uma das alterações mais comumente encontradas. Ferrer et al. (1991) observaram em dois cães diarreia crônica com presença de muco e estrias de sangue que não respondiam ao tratamento com antibiótico terapia. Os cães apresentaram repetidos exames de fezes sem presença de parasitos intestinais e no exame bioquímico uma elevação das proteínas plasmáticas totais, quando foram indicados ao exame de colonoscopia. Durante a biópsia a mucosa do cólon apresentava hiperemia difusa com pequenas áreas de erosão. Na microscopia observaram corpos basofílicos em vacúolos citoplasmáticos de numerosos macrófagos. Como os animais viviam em área endêmica da LVC foi realizado o exame de imuno-histoquímica da amostra de biópsia e a confirmação da doença veio com a visualização de formas amastigotas de *Leishmania*. Após a confirmação, um dos cães foi eutanasiado e o outro tratado para LVC apresentando melhora significativa do quadro de diarreia após dois meses do início do tratamento. O autor descreveu a diarreia crônica como sendo a primeira manifestação clínica da LVC apresentada pelos animais do estudo. González et al., 1990, por sua vez, descreveram alterações clínicas semelhantes, porém em cães experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*. Após aproximadamente um ano da indução da infecção, os cães apresentaram diarreia intermitente caracterizada por presença de muco e sangue nas fezes. A macroscopia não revelou presença de parasitos intestinais nos segmentos avaliados. Em nosso estudo, a avaliação e controle quanto ao volume e frequência de defecações (que caracterizaria a diarreia) e presença de alterações nas fezes como presença de muco e sangue, não foram avaliados. Isto, pode ter ocorrido devido à dificuldade de acompanhar a defecação de cada animal individualmente, uma vez que os mesmos permaneceram no canil distribuídos em coletivamente. Durante os exames clínicos, um animal apresentou moderada sensibilidade à palpação abdominal, porém o mesmo não apresentou quadro clínico sugestivo de diarreia ou vômito nem alterações macroscópicas evidente durante a necropsia que sugerissem correlação com a doença no TGI. Esse resultado está de acordo com Adamama-Moraitou et. al (2007) que não observou manifestações clínicas como diarreias ou vômitos em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* na Grécia. Entretanto os autores observaram através da biópsia de cólon, presença de hiperemia da mucosa, com áreas irregulares e/ou edema e pequenas áreas de erosão da mucosa classificando como uma colite assintomática em cães infectados com *Leishmania*.

Durante a necropsia não se observou alterações macroscópicas em todos os segmentos do TGI dos animais estudados. Mesmo após a vermifugação à presença de vermes intestinais (nematódeos e/ou cestódeos) foi encontrado em cinco cães. Possíveis explicações para este achado é a falha na vermifugação ou erros posológicos. Entretanto, Miró et al. (2007) ressaltaram que ainda não existem apresentações de vermífugos que apresentem eficácia frente a todos parasitos intestinais, e que é preciso rever as posologias e os fármacos de apresentação comercial. Keenan et al. (1984a) em estudo da LVC em cães experimentalmente infectados encontraram resultados positivos nos exames de fezes dos cães avaliados para outros parasitos intestinais. Os animais apresentaram no exame de fezes presença de ovos de áscaris. Os autores não citam se os animais foram vermifugados.

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

Em nossos estudos, cães dos grupos infectados apresentaram um aumento da celularidade inflamatória da lâmina própria e submucosa dos segmentos do TGI (com exceção do esôfago) em comparação com os animais controles. Um exsudato de células mononucleadas foi observado, com predominância de plasmócitos, macrófagos, e linfócitos sendo raros polimorfonucleares de permeio (neutrófilos e eosinófilos). Resultados semelhantes em cães naturalmente (Anderson et al., 1980; Longstaffe e Guy 1985; Ferrer et al., 1991; Silva, 2001;) e experimentalmente (Keenan 1984a; Keenan et al., 1984b; González et al., 1990) infectados foram encontrados. Em geral foram encontrados macrófagos parasitados com morfologia peculiar (citoplasma contendo vacúolos intracitoplasmáticos com formas amastigotas de *Leishmania*). Foi possível observar também, a presença de células

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

A análise microscópica pôde revelar a presença de parasitismo, sem surgimento de grandes lesões como extensas erosões ou úlceras na mucosa intestinal. Todavia, na literatura, trabalhos como de González et al. (1990) descreveram mecanismo baseados em microscopia eletrônica correlacionando sinais clínicos como o surgimento da diarreia. Os autores consideraram que a inflamação crônica difusa encontrada em intestino grosso está associada com a presença das formas amastigotas dentro de macrófagos no intestino. Devido à estimulação antigênica do parasito ocorre ativação do sistema imune e como resultado, há infiltração de linfócitos e plasmócitos, juntamente com macrófagos parasitados. A perda de absorção intestinal que desencadeia a diarreia está caracterizada pela degeneração hidrópica formada nas células do epitélio intestinal que acarretam na lise da célula com desenvolvimento de microerosões e perda do epitélio de absorção. A diarreia parece ser formada a partir da perda de epitélio intestinal devido à degeneração epitelial e do processo inflamatório na mucosa do cólon, que são fatores descritos por Argenzio (1978). Isto explicaria fatores para perda de absorção de água e eletrólitos. O animal pode apresentar um infiltrado inflamatório sem a presença da diarreia, ou seja, o grau de parasitismo não tem relação direta com a intensidade da resposta inflamatória e surgimento de sinais clínicos. Em nosso experimento, assim como descrito na literatura (Silva, 2001; Adamama-Moraitou et al., 2007; Toplu e Aydogan, 2011) não conseguimos estabelecer uma correlação precisa positiva ou negativa entre alterações microscópica (como infiltrado celular, parasitismo) e/ou presença de lesões que induzem surgimento de sinais clínicos.

Em nosso trabalho, resultados histopatológicos mostraram aumento de celularidade nos segmentos do TGI dos cães dos grupos naturalmente infectados. Toplu e Aydogan (2011) encontraram no TGI um aumento da celularidade difuso moderado. Também foi observado aumento da celularidade difuso intenso nos cães avaliados. O autor ainda descreve que o infiltrado foi restrito a lâmina própria adjacente a muscular da mucosa. Resultados semelhantes puderam ser visto por Silva, 2001 e em nosso trabalho, sendo que este aumento de celularidade foi visto também na submucosa. Entretanto, em nosso estudo, observamos que em alguns casos de aumento intenso da celularidade, houve um extravasamento celular da camada submucosa para camada mucosa. Em alguns casos uma hiperplasia dos folículos linfóides associado à mucosa foi encontrada alterando a arquitetura da lâmina própria, que se desloca em direção ao lúmen. Este resultado está de acordo com Silva (2001).

Assim como em outros órgãos já descritos na literatura como baço, fígado e pele (Tafuriet al., 1994; Gonçalves et al., 2003; Lima et al., 2007), a imuno-histoquímica apresentou resultados satisfatórios nos segmentos do TGI. Silva (2001) já havia descrito a ineficácia da técnica de imprint's para visualização da carga parasitária em TGI de cães naturalmente infectados. Esta técnica apresentou baixa sensibilidade, sendo difícil até mesmo a visualização de 100 núcleos de célula inflamatória por campo para caracterizar a contagem. Ferrer et al. (1991) após observar a marcação do parasito pela imuno-histoquímica descreveram que não se conhece a razão pela qual o parasito se localiza na mucosa intestinal. Os autores ainda sugerem que para diagnóstico diferencial da LVC no intestino devem-se incluir infecções por *Histoplasma*, *Salmonella*, *Yersinia* e *Prototheca* e outros parasitos como *Giardíase*, *Trichurys*, *Ancylostoma*, *Uncinaria*, *Entamoeba* e *Balantidium*. Além deste existem as doenças inflamatórias auto-imunes do intestino grosso como as colites plasmocítica-linfocítica e as colites histiocítica ulcerativa. O autor ressalva que a utilização da biópsia para detecção de parasitos, às vezes, pode ser pouco sensível devido ao baixo índice de amastigotas de *Leishmania* no intestino que dificultam a visualização pela H&E, sendo assim indicada a reação de imuno-histoquímica para estes casos, pois mesma se mostrou bastante eficiente. Já Adamama–Moraitouet al. (2007), observaram resultados semelhantes utilizando a imuno-histoquímica, porém com repetidos exames de fezes negativos, excluindo assim a possibilidade de outras doenças intestinais.

Em nossos estudos, nas regiões de todo o TGI (com exceção do esôfago) foram identificadas marcações pela reação da estreptoavidina-peroxidase. Silva (2001) obteve resultados semelhantes e ainda conseguiram inferir que as marcações na camada mucosa

tiveram uma tendência de maior concentração nas porções mais profundas, próximas à camada submucosa. Os autores ainda consideram que este fato pode ser mais bem compreendido levando-se em conta o tipo de circulação presente no TGI, que possibilita maior passagem das amastigotas para o interstício e, portanto, maior concentração de parasitos nas regiões onde estão presentes vasos de maior calibre. De fato, observamos que a maior concentração de marcações foi próxima à camada muscular da mucosa (na base da lâmina própria) somente em intestino grosso. Já na região proximal do TGI caracterizada por estômago, duodeno e íleo as marcações imuno-histoquímica foram encontradas em maior proporção (100% dos casos) próxima ao lúmen intestinal, difundidas entre as vilosidades. Plattet al. (2008) descreveram um estudo sobre macrófagos e regulação da resposta imune de mucosa em intestinos de camundongos e observaram que a microbiota presente no lúmen intestinal variam significativamente, sendo a porção jejunal (intestino delgado) quase estéril até a chegada no cólon descendente (intestino grosso) onde a microbiota comensal residente consiste em  $10^{12}$  organismos por grama de conteúdo do lúmen intestinal. Diante destes resultados, sugerimos que no intestino delgado de cães, a *Leishmania* aparece distribuída entre as vilosidades próximas ao lúmen intestinal e no intestino grosso, as formas do parasito apresentam-se isoladas da região, ficando concentrada próxima a base da lâmina própria. A partir disso é possível sugerir que esta diferença topográfica estaria relacionada com um mecanismo de evasão do parasito? Como se o parasito esquivassem de onde o sistema imune tem maior atividade de reconhecimento e combate contra antígenos?

MacDonald et al. (2011) descreveram que no TGI de seres humanos normais, que os linfócitos T constituem um terço das células do intestino na lâmina própria, semelhante a proporção de plasmócitos produtores de IgA e também cita a presença de macrófagos e células dendríticas. Os autores citam que no epitélio do intestino delgado contém aproximadamente um linfócito T para cada 10 células do epitélio intestinal, e já no cólon esta taxa pode chegar a um linfócito T para cada 20 células de epitélio intestinal. Com este resultado encontrado em seres humanos podemos sugerir que nos cães os achados de Silva (2001), que encontrou a presença da maior carga parasitária em intestino grosso, tem uma correlação direta (apesar de não ter sido quantificado os tipos celulares, e de ainda não se ter estudos deste tipo com intestino de cães). Entretanto Nagashima et al. (1996) descreveram que macrófagos não estavam exclusivamente localizados abaixo da camada epitelial que cobre a lâmina própria da mucosa, conforme descrito em seres humanos, mas estão distribuídos aleatoriamente por toda a lâmina própria do intestino humano. Esses achados levaram às

perguntas se macrófagos no intestino de cães realmente atuam como primeira linha de defesa por causa de sua distância das camadas epiteliais.

Além do intenso parasitismo em duodeno, ceco, cólon e reto verificado em nossos material, encontramos parasitismo em maior proporção no duodeno de um dos cães do grupo de cães infectados, que fez com que os valores se elevassem ao extremo, pois o mesmo encontrava-se parasitado de uma forma incomum. Tanto Ferrer et al. (1991) quanto Adamama- Moraitou et al. (2007) observaram presença de colites nos animais com e sem manifestação de sinais clínicos e a visualização do parasito em intestino grosso. Entretanto, nos dois experimentos somente foram realizadas biópsias (colonoscopia) para obtenção de amostras sendo que não foram coletadas amostras de intestino delgado não sendo possível fazer uma avaliação mais criteriosa do parasitismo. Silva(2001) mesmo considerando em suas conclusões que a técnica de imprint's em segmentos do TGI de não foram eficientes, os autores observaram que nos animais infectados da região endêmica de João Pessoa PB, apresentaram maior contagem de amastigotas na região de duodeno.

Com exceção do trabalho de Silva (2001) não existem relatos na literatura quanto ao estudo das várias regiões do TGI de cães infectados com *Leishmania*. Em seu trabalho, os autores avaliaram seis regiões distintas de todo o TGI de cães, a saber, estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco cólon. Em nossos trabalhos, fizemos um estudo semelhante neste aspecto, porém incluímos outras duas regiões: esôfago e reto. Não observamos marcações positivas de *Leishmania* em esôfago e jejuno dos animais. Entretanto, Silva(2001) observou em 27,7% de seus animais a presença de marcações positivas em jejuno. Viegas et al., 2012 encontraram formas amastigotas de *Leishmania* na língua de um cão. O animal apresentava leucopenia e trombocitopenia. Os autores conclui que as glossites nodulares devem conter como diagnóstico diferencial a LVC. Toplu e Aydogan, 2011 observaram uma extensa ulceração de lábio inferior em um cão, que microscopicamente revelou presença de formas amastigotas de *Leishmania*. Lesão semelhante foi visualizada em um dos cães do experimento, entretanto não foram identificadas formas amastigotas de *Leishmania* na microscopia (dado não publicado).

Em nosso trabalho, observamos a marcação positiva na região de reto dos animais sendo considerada uma região relativamente de fácil visualização do parasito. Villanueva et al. (1994) em um paciente humano portador do vírus HIV descreveu um caso de esofagite causada por *Leishmania*. Outros trabalhos sobre LVH envolvendo alterações esofágicas causadas por *Leishmania* (Mediavilla Garcia et al., 1992; Guitérrez-Macia et al., 1995;



Sollima et al., 1999) já foram descritos, entretanto em animais ainda não se possui relatos sobre a manifestação da doença na região de esôfago. Em nosso estudo não conseguimos encontrar presença de parasitos na região de esôfago.

Realizando a contagem da carga parasitária nos segmentos estudados, Silva( 2001) observou que as regiões mais parasitadas foram ceco e cólon dos grupos de cães ambos sintomáticos e assintomáticos. Em nossos trabalhos, observamos que as regiões de duodeno, ceco, cólon e reto foram mais parasitadas. Trabalhos envolvendo a LVH em duodeno já foram descritos (Álvarez-Nebreda et al., 2005; Mansedo González et al., 2006; Valenzuela et al., 2009;) entretanto, trabalhos deste sentido em cães ainda não foram relatados. Em nossos trabalhos um cão do grupo de cães infectados assintomáticos apresentou uma carga parasitária considerada incomum na região de duodeno. A carga parasitária apresentada por este animal foi superior à soma do mesmo segmento de todos os animais do grupo de cães sintomáticos. Silva (2001) cita em seu trabalho que as marcações positivas na região de duodeno não passaram de 27,7%, entretanto foi encontrada áreas de necrose e enterite nesta região de alguns dos animais durante a análise macroscópica. Além da região de duodeno, em nossos trabalhos observamos que as regiões de intestino grosso (ceco, cólon e reto) foram as que mais comumente apresentaram cargas parasitárias elevadas. Este achado é similar ao encontrado por Silva (2001) e por Pinto et al., (2011).

A utilização da inclusão em GMA em nosso experimento apresentou visivelmente resultados melhores quando comparada com a parafina (dados não publicados). Chiarini-Garcia (2011) descreveram que a inclusão de materiais biológicos em parafina, por usar xilol, parafina em altas temperaturas e pela dificuldade de obter cortes de pequena espessura, é um método muito extrativo, grosseiro e demorado que prejudica a definição histológica do material em estudo, além de ser mais demorado seu processamento, pior resolução ao microscópio de luz entre outras. Em nosso experimento foram utilizados três tipos de fixadores: a parafina, acetona PA e a solução de Carnoy's. Amaral et al., 2004 comparou os efeitos dos fixadores formalina e Bouin em fragmentos de endométrio de éguas incluídos em resina plástica e concluiu que os constituintes celulares e teciduais observados em fragmentos incluídos em resina plástica, apresentam melhor resolução para estudos citológicos ao microscópio de luz quando são fixados em formalina. Em nosso experimento, os tecidos caninos incluídos em solução Carnoy's apresentaram melhores resultados para análises histológicas em intestinos quando comparados à formalina. Foi possível ainda identificar que o fixador em questão, apresentou resultados satisfatórios para as outras colorações, quando

comparados às mesmas colorações em tecidos incluídos pela parafina fixados pela formalina (dados não publicados). Rocha e Chiarini – Garcia (2006) trabalharam com mastócitos de diversos tecidos em duas espécies de peixes e observaram que além do TGI ser o sistema que mais apresentou este tipo celular no estudo, que os mesmos podem apresentar heterogêneas características dentro da mesma espécie quando utilizados fixadores diferentes possivelmente devido a suas propriedades funcionais ou à sua sensibilidade aos fixadores. Em nosso trabalho a morfologia dos mesmos se manteve constante sem grandes alterações quanto as suas características quando utilizado o fixador Carnoy's.

Chiarini-Garcia (1996) ainda descreve nos protocolos da coloração de H&E a utilização do álcool acidulado (1ml de ácido clorídrico PA para 99ml de álcool 70% ) para diferenciação como item opcional à técnica. Em nosso experimento, obtivemos melhores resultados quando não utilizamos o álcool acidulado, ou quando utilizamos o mesmo usando uma diferenciação extremamente rápida (menor que 3 segundos), ou em concentrações menores. Em nosso trabalho, as colorações de H&E, azul de toluidina com borato de sódio, dominci e PAS em tecido canino fixados com solução Carnoy's e incluídos em resina plástica de metacrilato mostraram-se mais eficazes quando realizamos pequenas alterações nos protocolos (ver anexos) descritos por Chiarini-Garcia (1996).

Em nosso experimento, observamos com facilidade mastócitos difundidos pela mucosa e submucosa de todo o TGI dos cães do experimento. Foi possível observar que os cães infectados apresentaram uma menor quantidade de mastócitos que o grupo controle. Muitos são os trabalhos relacionados aos mastócitos e seu papel no processo inflamatório em modelo murino. Entretanto existem poucos trabalhos sobre a distribuição de mastócitos e suas características no TGI de cães (Kubeet al, 1998.;Locher et al, 2001;. Noviana et al, 2004). Figueiredo et al. (2009) observaram que os mastócitos na pele de cães não infectados era maior quando comparados aos cães infectados com LVC. Resultados semelhantes foram visualizados por Menezes-Souza et al., 2012 em pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. O estudo ainda discutiu que este tipo celular está aumentado em infecções crônicas e na pele de pacientes com Leishmaniose cutânea. Calabrese et al. 2010 descreveram uma intensa reação inflamatória na pele formado principalmente por mastócitos. Os autores concluem que estas células podem exercer um papel na imunidade inata contra a infecção por *L. infantum* porém são necessários maiores estudos sobre este tipo celular e sua relação com a doença.

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

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

## 6. Conclusões

1. Não foram observadas alterações clínicas nos cães infectados, bem como alterações macroscópicas no TGI, apesar do parasitismo tecidual comprovado pela histologia.

2. A solução de Carnoy's apresentou excelente eficácia como fixador dos diferentes tecidos caninos estudados e em todas as colorações testadas, quando fixados durante 3 horas à 4°C.

3. A utilização de tecidos caninos fixados em Carnoy's e incluídos em GMA mostrou melhores resultados para as colorações rotineiras de histologia quando comparado com tecidos incluídos em parafina.

4. Não houve relação entre sinais clínicos, alterações macro e microscópicas e carga parasitária ao longo de todo o TGI.

5. Na LVC, independente da forma clínica, houve aumento da celularidade da lamina própria de todos os segmentos do TGI.

6. Os plasmócitos, linfócitos e macrófagos foram as células predominantes na lâmina própria de todos os segmentos do TGI (exceto esôfago). Células polimorfonucleares como neutrófilo e eosinófilos raramente estavam associadas ao infiltrado de mononucleares.

7. A presença de elevada carga parasitária no duodeno de um cão assintomático foi considerado um achado incomum, pois elevadas cargas parasitárias são encontradas somente no intestino grosso.

## Referências Bibliográficas:

- ADAMAMA-MORAITOU KK, RALLIS TS, KOYTINAS AF, TONTIS D, PLEVRAKI K, KRITSEPI M. **Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study.** *Am J Trop Med Hyg.* 2007. 76(1):p.53-7.
- ALONSO MJ, MUÑOZ E, PICAZO A, ABAD MM, GÓMEZ F, ROLDÁN M, LAGUNA F, PAZ JI, LÓPEZ-BRAVO A. **Duodenal leishmaniasis diagnosed by biopsy in two HIV-positive patients.** *Pathol Res Pract*, 1997. 193(1), p.43-7.
- ALVAR J, CANAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. **Canine leishmaniasis.** *Adv Parasitol*, 2004. 57, p.1-88.
- ALVAREZ-NEBREDA ML, ALVAREZ-FERNÁNDEZ E, RADA S, BRAÑAS F, MARAÑÓN E, VIDÁN MT, SERRA-REXACH JA. **Unusual duodenal presentation of leishmaniasis.** *J Clin Pathol.* 2005. 58(12): p.1321-2.
- AMARAL D, CHIARINI-GARCIA H, VALE FILHO VR, ALLEN, WR. **Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias do endométrio de éguas após inclusão em resina plástica.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2004. 56(1): p.7-12.
- ANDERSON DC, BUCKNER RG, GLENN BL, MACVEAN DW. **Endemic canine leishmaniasis.** *Vet Pathol.* 1980. 17(1): p.94-6.
- ARAUJO SA, NASCENTES-QUEIROZ TC, DEMAS ALVARES CABRAL MM. **Colonic leishmaniasis followed by liver transplantation.** *Am J Trop Med Hyg.* 2010. 83(2): p.209.
- ARGENZIO RA. **Physiology of diarrhea--large intestine.** *J Am Vet Med Assoc.* 1978 173 (1): p.667-72. Review.
- ASHFORD RW. **The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses.** *Int J. Parasitol.* 2000. 30(12/13): p.1269-1281.
- BEJARANO EE, URIBE S, ROJAS W, VELEZ ID. **Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001. 95: p.27-28.
- BERN C, MAGUIRE JH, ALVAR J. **Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2008. 2: p.313.
- CALABRESE KS, CORTADA VM, DORVAL ME, SOUZA LIMA MA, OSHIRO ET, SOUZA CS, SILVA-ALMEIDA M, CARVALHO LO, GONÇALVES DA COSTA SC, ABREU-SILVA AL. ***Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas.** *Experimental Parasitology.* 2010. 124: p.253-257.
- CALIARI MV. **Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes.** Belo Horizonte: Editora UFMG. 1997. 149.
- CARDOSO L, NETO F, SOUSA JC, RODRIGUES M, CABRAL M. **Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity.** *Vet Parasitol.* 1998. 79(3): p.213-20.

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

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

CHIARINI-GARCIA H, PARREIRA GG, ALMEIDA FR. **Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model.** *Methods Mol Biol.* 2011.689: p.3-18.

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

DE ALMEIDA FERREIRA S, LEITE RS, ITUASSU LT, ALMEIDA GG, SOUZA DM, FUJIWARA RT, DE ANDRADE AS, MELO MN. **Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4): e1596.

DENVES BA. **Leishmaniose: Histórico, etiologia, epidemiologia, sinais clínicos, diagnóstico e controle.** *PubVet.* 2008.2. p.11-19

DOS SANTOS SO, ARIAS JR, DE PAIVA HM, FURLAN MB, FERREIRA WF. **The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*.** Corumba, Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003. 36: p. 33–634.

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

FELICIANGELI MD, RODRIGUEZ N, DE GUGLIELMO Z, RODRIGUEZ A. **The reemergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela.** *II. Vectors and parasites.* 1999.6: p.113–120.

FERRER L, JUANOLA B, RAMOS JA, RAMIS A. **Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs.** *Vet Pathol.* 1991. 28(4): p.342-3.

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

FREITAS LAR, SILVA LR, BADARÓ RA. **A patologia intestinal no calazar: estudo morfológico de 31 fragmentos de mucosa jejunal, obtidas por biópsis perorais de 20 crianças.** *Rev. Med. Minas Gerais.* 1995. 5(2).

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

GONÇALVES R, TAFURI WL, MELO MN, RASO P, TAFURI WL. **Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a**

**histopathological and morphometric study.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003. 45(3): p.153-8.

GONZÁLEZ JL, FERMIN ML, GARCIA P, ROLLAN E, CASTAÑO M. **Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis.** *ZentralblVeterinarmed B.* 1990. 37(5): p.377-82.

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

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

GRIMALDI JR, TESH GERB. **Leishmanioses of the New World: Current concepts and implications for future research.** *Clin.Microbiol. Ver.*1993. 6: p.230-250.

HAMOUR AA, SKELLY R, JOWITT SN, WILSON GE, CURRY A, WILKINS EG, MANDAL BK. **Visceral leishmaniasis (Kala-azar) in two patients with HIV-1 infection: atypical features and response to therapy.** *J Infect.* 1998. 36(2): p.217-20.

HERVÁS J, MÉNDEZ A, CARRASCO L, GÓMEZ-VILLAMANDOS JC. **Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canisaureus*).** *Vet Rec.* 1996. 139(12): p.293-5.

HERWALDT BL. **Leishmaniasis.** *Lancet.* 1999. 354(9185): p.1191-1199.

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

KEENAN CM, HENDRICKS LD, LIGHTNER L, JOHNSON AJ. **Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II.Pathology.** *Vet Pathol.* 1984b. 21(1): p.80-6..

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

LAGUNA F, LÓPEZ-VÉLEZ R, SORIANO V, MONTILLA P, ALVAR J, GONZÁLEZ-LAHOZ JM. **Gastrointestinal leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients: report of five cases and review.** *ClinInfectDis.* 1994a.19(1): p.48-53.

LAGUNA F, SORIANO V, VALENCIA E, GONZÁLEZ-LAHOZ JM. **Gastrointestinal leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus.** *RevClin Esp.* 1994b. 194(6): p.510-1.

LIMA WG, OLIVEIRA PS, CALIARI MV, GONÇALVES R, MICHALICK MS, MELO MN, TAFURI WL, TAFURI WL. **Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*.** *Vet Immu. andImmunopathol.* 2007.117(1-2): p.129-136.

LOCHER C, TIPOLD A, WELLE M, BUSATO A, ZURBRIGGEN A, GRIOT-WENK ME. **Quantitative assessment of mast cells and expression of IgE protein and mRNA for IgE**

and interleukin 4 in the gastrointestinal tract of healthy dogs and dogs with inflammatory bowel disease. *Am J Vet Res.* 2001. 62(2): p.211-6.

LONGSTAFFE JA & GUY MW. **Leishmaniasis in dogs.** *Vet Annu.* 1985. 25: p. 358-367.

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

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

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

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

MENEZES-SOUZA D, GUERRA-SÁ R, CARNEIRO CM, VITORIANO-SOUZA J, GIUNCHETT RC, TEIXEIRA-CARVALHO A, SILVEIRA-LEMOS D, OLIVEIRA G C, REIS AB. **Higher Expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 Chemokines in the Skin Associated with Parasite Density in Canine Visceral Leishmaniasis.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2012.6(4):e1566.

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

MUIGAI R, GATEI DG, SHAUNAK S, WOZNAK A, BRYCESON AD. **Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis.** *Lancet.* 1983.27: p.476-479.

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

NIETO CG, GARCÍA-ALONSO M, REQUENA JM, MIRÓN C, SOTO M, ALONSO C, NAVARRETE I. **Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis.** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1999. 67(2): p.117-130.

NOVIANA D, MAMBA K, MAKIMURA S, HORII Y. **Distribution, histochemical and enzyme histochemical characterization of mast cells in dogs.** *J Mol Histol.* 2004.35(2): p.123-32.

OLIVEIRA FM, HORTA BC, PRATA LO, SANTIAGO AF, ALVES AC, FARIA AM, GOMES MA, CALIARI MV. **Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice.** *Infect Dis Rep.* 2012. 274(2):e27. eCollection.



PINTO AJW, FIGUEIREDO MM, SILVA FL, MARTINS T, MICHALICK MS, TAFURI WL, TAFURI WL. **Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum***. *Acta Vet Scand*, 2011.13(53): p.67-75.

PLATT AM, MOWAT AM. **Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine**. *ImmunolLetter*. 2008. 119(1-2): p. 22-31.Review.

REIS AB, TEIXEIRA-CARVALHO A, GIUNCHETTI RC, GUERRA LL, CARVALHO MG, MAYRINK W, GENARO O, CORRÊA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA. **Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmaniachagasi***. *ClinExpImmunol*. 2006.146(2): p.303-11.

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

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

ROIG P, CUADRADO JM, BENÉITEZ C, MAYOL MJ, LÓPEZ M, NAVARRO V, NIETO A, BERNACER B. - **Visceral leishmaniasis located in the intestines in patients with human immunodeficiency virus infection: a report of 2 cases**. *RevClin Esp*.1993.192(6): p.271-3.Review.

ROSENTHAL PJ, CHAISSON RE, HADLEY WK, LEECH JH. **Rectal leishmaniasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome**. *Am J Med*.1988. 84(2): p.307-9.

ROSS, R. (1) **Note on the bodies recently described by *Leishman-Donovan* and (2) Further notes on *Leishman's bodies***. *Brit. Med*. 1906.2: p.1261-1401.

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

SILVA FL. **Estudo histopatológico e imuno-histoquímico do trato gastrintestinal de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. (Dissertação de Mestrado). *Clinica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte*, 2001.p.15-30

SILVA FL, TAFURI WL, OLIVEIRA MR, TAFURI WL. **Histopathological and immunohistochemiscal study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a case report**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária*. 2002. 54(4):p.340-344.

SLAPPENDEL RJ. **Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands**. *Vet Q*.1988. 10(1): p.1-16.

SOLANO-GALLEGO L. MIRÓ G, KOUTINAS A, CARDOSO L, PENNISI GM, FERRER L, BOURDEAU B, OLIVA G, BANETH G. **LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis**. *Parasites & Vectors*. 2011. 4:86.

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

TAFURI WL. **Leishmaniose visceral em cães naturalmente e experimentalmente infectados: histopatologia e estudo imunocitoquímico dos receptores do tipo 3 (CR3-CD11b/CD18) e 4 (CD11c/CD18) do complemento e dos antígenos de histocompatibilidade da classe II no fígado e órgãos linfóides.(Doutorado).***Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.*1995, p.30-207.

TAFURI WL, SANTOS RL, ARANTES RM, GONÇALVES R, DE MELO MN, MICHALICK MS, TAFURI WL. **An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues.***J Immunol Methods.* 2004. 292(1-2): p.17-23.

TOPLU N AND AYDOGAN A: **An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis.** *Parasitol Res.* 2011.109(4): p.1051-7.

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

VALENZUELA EJ, RODRIGO AJL, PEÑARANDA GC, TORROBA A, MOLINA MJ, CARBALLO AF. **Duodenal leishmaniasis in a HIV patient.***Rev Esp Enferm Dig.* 2009.101(1): p.60-2.

VIEGAS C, REQUICHA J, ALBUQUERQUE C, SARGO T, MACHADO J, DIAS I, PIRES MA, CAMPINO L, CARDOSO L. **Tonguenodules in canine leishmaniosis - a case report.***Parasit Vectors.* 2012; 5(120): p.1-5.

VILLANUEVA JL, TORRE-CISNEROS J, JURADO R, VILLAR A, MONTERO M, LÓPEZ F, SÁNCHEZ-GUIJO P, KINDELÁN JM. **Leishmania esophagitis in an AIDS patient: an unusual form of visceral leishmaniasis.***Am J Gastroenterol.* 1994.89(2): p.273-5.

WERNECK GL, RODRIGUES L, SANTOS MV, ARAUJO IB, MOURA LS. **The burden of Leishmania chagasi infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil.***Acta Trop.*2002.83: p.13–18.

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

ZERPA O, ULRICH M, BORGES R, RODRIGUEZ V, CENTENO M. **Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela.** *Rev Panam Salud Publica.* 2003. 13: p. 239–245.

## Anexo A

Processamento, infiltração e inclusão em GMA.

- Desidratação: fragmento possui grande quantidade de H<sub>2</sub>O;

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

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

Solução infiltração:

50ml BASIC RESIN/Liquid

+

1packet (0.5g) ACTIVATOR

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

-Inclusão: Solução de inclusão:

15ml SOLUÇÃO DE INFILTRAÇÃO NOVA

+

1ml HARDENER

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

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

## Anexo B

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

#### Reagentes -

##### Hematoxilina de Harris

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

##### Eosina aquosa - segundo Lison

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

##### Solução de alumínio de ferro a 2%

- alumínio de ferro ..... 2g
- água destilada ..... 100 ml

##### Solução de álcool acidulado

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

#### Coloração

- a. Lavar em água corrente ..... 5'
- b. Solução de alumínio de ferro a 2% ..... 10'
- c. Lavar em água corrente ..... 5'
- d. Corar com hematoxilina ..... 3 a 15'
- e. Lavar em água corrente ..... 10'
- f. diferenciar com álcool acidulado – EXTREMAMENTE RÁPIDA
- g. Lavar em água corrente ..... 5'
- h. Corar com eosina ..... 30" a 2' 73
- i. Lavar em água corrente ..... até retirar o excesso de corante
- j. Secar em estufa ou na temperatura ambiente
- k. Montar

#### OBSERVAÇÕES:

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

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

### **Reagentes**

Solução corante

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

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

### **Coloração**

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

### **OBSERVAÇÕES:**

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

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

Reagentes -

Solução de ácido periódico a 0,5%

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

Reativo de Schiff

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

Bissulfito de Sódio

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

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

- Preparo do HCl 1N = 8,35 ml HCl + 91,65 ml de água (HCl com densidade 1,192, PM de 36,46 e a 36,1%)

#### Coloração

- a. Lavar em água destilada ..... 5'
- b. Ácido periódico a 0,5% ..... 10 a 20' .
- c. Lavar em água destilada ..... 5'
- d. Reativo de Schiff ..... 30 a 60'
- e. Lavar em 1 banho de bissulfito de sódio 1% .. 3'
- f. Lavar em água corrente ..... 30' 75
- g. Corar com hematoxilina (opcional) ..... 5'
- h. Lavar em água corrente ..... 30'
- i. Secar em estufa ou à temperatura ambiente
- j. Montar

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

## Anexo C

### PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA REAÇÃO STREPTAVIDINA-PEROXIDASE

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

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

OBS: Lâminas Criostato começar nos álcoois

Para 1 litro de PBS 1X

100mL de PBS concentrado e 900mL de água destilada

2- Dar 01 banho de PBS (1X) – 5 min.

3 – Bloqueio da Peroxidase Endógena :

Colocar os cortes em solução de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 volumes por 20 a 30 min.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30v ----- 3,5 ml ----- 7,0 ml ----- 10 ml

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

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

5- Bloqueio dos Sítios de Ligações Antigênicos Inespecíficos :

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

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

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

6 - Dar 01 banho de PBS 1X

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

1: 100 .Incubar em câmara úmida a 4oC (geladeira) por 16 a 18 horas (“overnight”).

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

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

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

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

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

13- Revelação :

PBS \_\_\_\_\_ 200 ml \_\_\_\_\_ 250 ml

DAB \_\_\_\_\_ 50 mg (= 0,050 g) \_\_\_\_\_ 60 mg

OBS: Homogeneizar bem o DAB antes de filtrar e Filtrar a Hematoxilina Incubar os cortes por 5 min. (controle ao microscópio óptico)

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

15- Lavar em água corrente por 10 minutos

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

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

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

Montar



## Anexo D



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

## CERTIFICADO

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

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

## CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 10 de Março de 2009.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
Coordenador do CETEA/UFMG

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

