

ELIANE PERLATTO MOURA

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNOLÓGICO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO EM
LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS**

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFMG

2007

ELIANE PERLATTO MOURA

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E IMUNOLÓGICO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM
ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO EM
LIPOSSOMAS NANOMÉTRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Protozoologia

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marilene S. M. Michalick

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFMG

2007

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Neuroimunopatologia Experimental – NIPE - Departamento de Patologia Geral e no Laboratório de Sorologia de Leishmaniose - Departamento de Parasitologia, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob orientação do Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Marilene Suzan Marques Michalick.

Auxílio Financeiro: FAPEMIG e CNPq.

*“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre,
umas porque nos vão ajudando na construção,
outras porque nos apresentam projetos de sonho e
outras ainda porque nos desafiam a construí-los.”*

Dedico este trabalho,

A Josemar, Henrique e Tatiana,

Por tudo isso e muito mais ...

*“A maior recompensa do nosso trabalho,
não é o que nos pagam por ele,
mas aquilo em que ele nos
transforma.”*

John Ruskin

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Wagner Luiz Tafuri, meu orientador, pela humildade, solicitude, conhecimento, respeito e principalmente amizade demonstrados no decorrer deste trabalho, fundamentais para o meu crescimento profissional e científico.

À Prof. Marilene Susan Marques Michalick, minha co-orientadora, cuja competência, respeito ao próximo e incentivo constantes, a tornam um grande exemplo a ser seguido.

À Prof. Norma Melo, por seu carinho, incentivo e apoio constantes.

Ao Prof. Washington Luiz Tafuri, pelo grande exemplo de dignidade no ensino e na pesquisa.

Às Professoras Denise e Rosa, pelo convívio, apoio, compreensão e amizade.

Aos Professores Alan Lane e Kenneth Gollob, cujas colaborações foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Sumara Ferreira, secretária da Pós-Graduação, pelo carinho, amizade, incentivo e apoio.

Às funcionárias do Departamento de Patologia, Regina, Vânia, Jaqueline e Olinda, pela colaboração e amizade.

Ao Raul, pela grande amizade, apoio e respeito demonstrados ao dividir comigo a realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos e companheiros Wanderson, Ferdinan, Cíntia, Vanessa, Marta, Felipe e Mariana, pela grande ajuda, amizade e apoio, imprescindíveis na realização deste trabalho.

Ao meu colega Weverton, "*in memoriam*", cuja presença ainda continua entre nós.

Aos colegas do NIPE - Luana, Cláudia, Maria, Letícia, Sandra, Camila, Carolina, Sílvia, Mirna, Lucélia, pelo agradável convívio, risadas e sofrimentos compartilhados.

Aos amigos Sidney, Eloísa, Belinha pela ajuda e amizade.

Aos meus familiares, pelo apoio e incentivo.

A todos aqueles não citados nominalmente, mas cujas contribuições foram de suma relevância em meu desenvolvimento científico e pessoal, bem como na realização deste trabalho,

A todos,
minha sincera gratidão.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADS	Solução de diluição de anticorpos
BSA	Solução de albumina bovina
C	Grupo de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> não tratados (controle)
CDC	Centro de Controle de Doenças
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFSE	5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CR3	Receptor para o terceiro fator do complemento
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent assay
Fc γ R	Receptor para a porção Fc das imunoglobulinas
Gp63	Metaloprotease
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
HIQ	Imuno-histoquímica
ICAMs	Moléculas de adesão intercelular
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucinas
LDU	Leishman donovani units
LMA	Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas
Lp	Grupo de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com lipossomas vazios
LPG	Lipofosfoglicanos
Lp-Sb	Grupo de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglunina encapsulado em lipossomas nanométricos
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
MHC I	Complexo de histocompatibilidade principal da classe 1
MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal da classe 2
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffer Saline
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucleico
SMM	Sistema monocítico mononuclear

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Expressão de CD11a em monócitos – Citometria de fluxo	19
FIGURA 2	Expressão de CD11b em monócitos - Citometria de fluxo	20
FIGURA 3	Expressão de MHC classe II e CD14 em monócitos - Citometria de fluxo	21
FIGURA 4	Porcentagem de Linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ - Citometria de fluxo	21
FIGURA 5	Fragmentos de baço de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> .	38
FIGURA 6	Fragmentos de baço obtidos em criostato de cães naturalmente infectados com <i>Leishmania chagasi</i>	39
FIGURA 7	Fragmentos de fígado de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i>	44
FIGURA 8	Fragmentos de fígado obtidos em criostato de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> .	45
FIGURA 9	Fragmentos de linfonodo cervical de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> .	50
FIGURA 10	Fragmentos de medula óssea de cão naturalmente infectado	52
FIGURA 11	Fragmentos de pele de cão naturalmente infectado com <i>L. chagasi</i>	56
GRÁFICO 1	Freqüência dos sinais clínicos manifestados nos cães naturalmente infectados antes do tratamento.	27
GRÁFICO 2	Alterações histopatológicas observadas no baço de cães naturalmente infectados.	36
GRÁFICO 3	Marcação fenotípica das células do baço em cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos.	37
GRÁFICO 4	Determinação do número de amastigotas no baço, pelas técnicas de LDU (A) e imuno-histoquímica (B) em cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos.	37
GRÁFICO 5	Alterações histopatológicas observadas no fígado de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> .	41
GRÁFICO 6	Marcação fenotípica das células do fígado em cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos	42
GRÁFICO 7	Determinação do número de amastigotas no fígado, pela técnica de imuno-histoquímica, em cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em	43

lipossomas nanométricos.

GRÁFICO 8	Alterações histopatológicas observadas no linfonodo cervical de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i>	47
GRÁFICO 9	Marcação fenotípica das células do linfonodo cervical em cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos	48
GRÁFICO 10	Avaliação da densidade de parasitos no linfonodo cervical pela técnica de imuno-histoquímica em cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas	49
GRÁFICO 11	Determinação do número de amastigotas na medula óssea, pelas técnicas de LDU (A) e imuno-histoquímica (B) em cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos.	51
GRÁFICO 12	Alterações histopatológicas observadas na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> .	54
GRÁFICO 13	Análise fenotípica das células da pele de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas	55
GRÁFICO 14	Determinação do número de amastigotas na pele de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas, pela técnica de imuno-histoquímica.	55
QUADRO 1	Anticorpos utilizados na fenotipagem das células sanguíneas	18
QUADRO 2	Anticorpos utilizados na fenotipagem das células teciduais	26

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Expressão de CD11a,b na superfície de monócitos do sangue periférico de cães infectados com <i>L. chagasi</i> , tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos.	29
TABELA 2	Expressão de CD11a,b na superfície de monócitos do sangue periférico de cães infectados com <i>L. chagasi</i> , tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, após interação <i>in vitro</i> com <i>L. chagasi</i> na presença ou não de soro C5 ^{-/-} .	30
TABELA 3	Expressão de CD11a,b na superfície de monócitos do sangue periférico de cães infectados com <i>L. chagasi</i> , tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, apresentando dupla marcação (CD11a,b/ <i>Leishmania</i>).	31
TABELA 4	Expressão de CD11a,b na superfície de monócitos do sangue periférico de cães infectados com <i>L. chagasi</i> , tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, apresentando dupla marcação (CD11a,b/ <i>Leishmania</i>).	32
TABELA 5	Expressão de MHC classe II e CD14 em monócitos e frequência das subclasses de linfócitos T presentes no sangue periférico de cães infectados com <i>L. chagasi</i> , tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos.	33
TABELA 6	Relação peso do baço/peso corporal (peso relativo) e o tamanho do órgão de cães infectados com <i>L. chagasi</i> , submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos	34
TABELA 7	Relação peso do fígado/peso corporal (peso relativo) e o tamanho do órgão de cães infectados com <i>L. chagasi</i> , submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos.	40
TABELA 8	Relação peso do linfonodo cervical/peso corporal (peso relativo) de cães infectados com <i>L. chagasi</i> , submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de dimensões nanométricas.	46

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do tratamento com múltiplas doses de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas (LMA) nas alterações histológicas e em aspectos imunológicos, em cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. Os cães receberam 4 doses intravenosas (IV) de LMA (6,5 mg Sb/kg, N=12), ou lipossomas vazios (dose proporcional ao grupo tratado, N=12). Um terceiro grupo de animais não foi tratado (N=12). O sangue periférico foi coletado 30 e 60 dias após o tratamento. As promastigotas de *L. chagasi* foram marcadas com CFSE e a interação *Leishmania*-monócitos foi realizada na presença e na ausência de soro deficiente do fator cinco do complemento (C5-/-). As células mononucleares foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD11a,b,c, anti-MHC classe II, anti-CD14, anti-CD4 e anti-CD8 e analisados por citometria de fluxo. 150 dias após o término do tratamento todos os animais foram eutanaziados e amostras do baço, fígado, linfonodo cervical, medula óssea e pele (orelha) foram coletadas durante a necropsia e fixadas em solução de formol tamponado (10%) para estudos histopatológicos e parasitológicos. Outros fragmentos dos órgãos foram congelados e processados para caracterização dos antígenos CD11a,b,/CD18 nos tecidos. Análises semi-quantitativas das alterações histopatológicas e quantitativas da carga parasitária e da expressão de CD11a e CD11b tecidual foram realizadas utilizando microscopia óptica. Nossos resultados mostram que a diminuição da expressão de CD11b, na superfície dos monócitos, observada após interação *in vitro* com *L. chagasi*, especialmente na presença de soro C5-/-, sugere a importância deste receptor na interação *L. chagasi*-monócitos caninos. Em relação ao tratamento com LMA, este aumentou a expressão de CD11b na superfície dos monócitos, 60 dias após término do protocolo experimental. Entretanto, esse aumento não se correlacionou com maior adesão de *L. chagasi* aos monócitos caninos, *in vitro*. O tratamento com LMA não alterou a expressão de MHC da classe II e CD14 nos monócitos caninos e a frequência de linfócitos T CD4⁺, mas manteve a frequência de linfócitos T CD8⁺ por um período mais prolongado, indicando que o tratamento foi capaz de estimular uma resposta imune celular. Nas análises teciduais constatou-se que a carga parasitária dos animais tratados com LMA foi estatisticamente menor em relação ao grupo controle, exceto na medula óssea e na pele. O baço dos cães tratados mostrou maior reatividade (hiperplasia da polpa branca) com preservação das áreas T dependentes. Por outro lado, no fígado, os animais tratados mostraram alterações menos intensas que os animais controle, que apresentaram maior número de granulomas intralobulares e maior intensidade do processo inflamatório nos espaço porta hepáticos. Não houve diferença na expressão de CD11a,b/CD18 entre os diferentes grupos. Esses resultados mostram que este protocolo de tratamento foi capaz de alterar a resposta imunológica, aumentando a expressão de CD11b, diminuindo a adesão das promastigotas de *L. chagasi* aos monócitos caninos *in vitro* e

mantendo os níveis de linfócitos T CD8⁺ no sangue circulante. Esta formulação proporcionou redução significativa da carga parasitária no baço, fígado e linfonodo cervical, mas ainda não foi capaz de reduzi-la na medula óssea e na pele. Adicionalmente, alterações histopatológicas distintas foram observadas no baço e fígado dos grupos analisados, sugerindo que este protocolo de tratamento pode estar estimulando uma resposta imune órgão-específica.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the impact of a multiple dose regimen of a liposomal formulation of meglumine antimoniate (LMA), in some histological, immunohistochemical and immunological features, in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Dogs received 4 intravenous doses of either LMA (6.5 mg Sb/kg body weight, N = 12), or empty liposomes (at the same lipid dose as LMA, N = 12) at 4-day intervals. A third group of animals was untreated (N = 12). Peripheral blood was collected 30 and 60 days after treatment. The interaction between canine monocytes and *L. chagasi* promastigotes "in vitro", stained with the fluorescent dye CFSE, were carried out in the presence or absence of exogenous serum. After, cells were stained with monoclonal antibodies anti-CD11a, CD11b, CD11c, MHC class II, CD14, CD4 e CD8 antigens and analyzed by flow cytometry. After 150 days of the treatment with LMA, all animals were euthanized and samples of spleen, liver, cervical lymph nodes, bone-marrow and skin (ear) were collected during necropsy and fixed in 10% formalin solution for histological and parasitological studies. Other tissue samples were frozen and processed for CD11a,b/CD18 antigens characterization. A semi-quantitative study of histological alterations, a quantitative study of parasite load and CD11b expression by histo-morphometric method were carried out under optical microscope analysis. Our results indicate that the decrease of CD11b expression after infection *in vitro* with *L. chagasi*, especially in the presence of C5 deficient serum, suggests the importance of these receptors in the *L.chagasi*-monocyte interaction in canine model. The treatment with LMA had influence in CD11b expression in monocytes surface. Peripheral cells CD11b expression was more highly expressed by monocytes from treated animals only before the *Leishmania* interaction *in vitro*. However, after this interaction, the treatment with LMA inhibited adhesion opsonized promastigotas and canine monocytes. The treatment with LMA did not alter the MHC class II and CD14 expression of canine monocytes from peripheral blood and CD4 expression of canine lymphocytes, but maintain CD8 positive cells for a long term period after treatment indicate that the treatment was able to maintain an effective immune cellular response. A parasite load was statistical lower than controls in all organs, excepted in the bone marrow and skin. The spleens of treated dogs showed more reactive, however, treated animals showed less histological alterations than controls in the liver. We did not find any statistical difference related of the parasite load and CD11a,b expression in all organs. These results showed that this treatment protocol is able to alter the immune response, increasing CD11b expression, reducing the adhesion opsonized promastigotas and canine monocytes and maintain CD8 positive cells for a long term period after treatment. This formulation reduced tissues parasite load in the spleen, liver and cervical lymph nodes, except bone marrow and skin. In addition, distinct histopatological alterations observed in

the spleen and liver suggest that treatment protocol might provoke an organ-specific immune response.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	I
1.1 - LEISHMANIOSES	2
1.2 - LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)	4
1.3 - INTERAÇÃO LEISHMANIA HOSPEDEIRO VERTEBRADO	6
1.4 - RESPOSTA IMUNE	10
1.5 - TRATAMENTO DA LVC	11
2 - OBJETIVOS	14
2.1 - OBJETIVO GERAL	14
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 - MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 - ANIMAIS	15
3.1.1 - Critérios de inclusão no estudo	15
3.1.2 - Manuseio dos animais	15
3.1.3 - Grupos Experimentais	15
3.2 - COMITÊ DE ÉTICA EXPERIMENTAL ANIMAL	16
3.3 - ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO	16
3.3.1 - Coleta de sangue	16
3.3.2 - Obtenção das células mononucleares	16
3.3.3 - Parasitos	17
3.3.4 - Marcação dos Parasitos com CFSE	17
3.3.5 - Interação Leishmania e células mononucleares	17
3.3.6 - Anticorpos	17
3.3.7 - Interação suspensão Leishmania-células mononucleares e anticorpos específicos	18
3.3.8 - Avaliação da expressão do receptor CD11a/CD18 na superfície dos monócitos	19
3.3.9 - Avaliação da expressão do receptor CD11b/CD18 na superfície dos monócitos	20
3.3.10 - Avaliação da expressão de moléculas de MHC classe II e moléculas de CD14 na superfície dos monócitos	21
3.3.11 - Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no sangue periférico	21
3.4 - HISTOPATOLOGIA E DENSIDADE PARASITÁRIA DOS ÓRGÃOS	22
3.4.1 - Punção de medula óssea	22
3.4.2 - Eutanásia dos animais	22
3.4.3 - Coleta de fragmentos dos órgãos	22
3.4.4 - Avaliação histopatológica dos órgãos	22
3.4.5 - Técnica da hematoxilina-eosina (HE)	23
3.4.6 - Avaliação da densidade de parasitos nos órgãos	24
3.4.7 - Técnica da estreptoavidina- peroxidase para detecção de formas amastigotas	24
3.5 - ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES TECIDUAIS	25
3.5.1 - Técnica da imuno-histoquímica para fenotipagem das células teciduais	25
3.5.2 - Análise das células marcadas	26
3.6 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
4 - RESULTADOS	27

4.1 – ASPECTOS CLÍNICOS DOS CÃES NATURALMENTE INFECTADOS.....	27
4.1.1 – Aspectos clínicos observados antes do tratamento.....	27
4.1.2 – Aspectos clínicos observados depois do tratamento.....	28
4.2 RESULTADOS DA ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES CANINAS OBTIDAS DO SANGUE PERIFÉRICO.....	28
4.3 - ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA DO BAÇO.....	34
4.3.1 - Alterações macroscópicas.....	34
4.3.2 – Alterações microscópicas.....	34
4.3.3 – Caracterização por imuno-histoquímica do baço com marcação para os receptores CD11a,b/CD18.....	36
4.3.4 – Avaliação da densidade parasitária.....	37
4.4 - ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA DO FÍGADO.....	40
4.4.1 – Alterações macroscópicas.....	40
4.4.2 – Alterações microscópicas.....	40
4.4.3 – Caracterização por imuno-histoquímica das células do fígado com marcação para os receptores CD11a,b/CD18.....	42
4.4.4 – Avaliação da densidade de parasitos.....	42
4.5 - ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA DO LINFONODO CERVICAL.....	46
4.5.1 - Alterações macroscópicas.....	46
4.5.2 – Alterações microscópicas.....	46
4.5.3 – Caracterização por imuno-histoquímica das células do linfonodo cervical com marcação para os receptores CD11a,b/CD18.....	48
4.5.4 – Avaliação da densidade de parasitos.....	48
4.6 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS DA MEDULA ÓSSEA.....	51
4.6.1 – Alterações microscópicas.....	51
4.6.2 – Avaliação da densidade de parasitos.....	51
4.7 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA PELE.....	53
4.7.1 – Alterações macroscópicas.....	53
4.7.2 – Alterações microscópicas.....	53
4.7.3 – Caracterização por imuno-histoquímica das células da pele com marcação para os receptores CD11a,b/CD18.....	54
4.7.4 – Avaliação da densidade de parasitos.....	55
5- DISCUSSÃO.....	57
5.1 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CD11A,B,C/CD18 NOS MONÓCITOS PROVENIENTES DO SANGUE PERIFÉRICO.	58
5.2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CD11A,B/CD18 NOS MONÓCITOS PROVENIENTES DO SANGUE PERIFÉRICO, APÓS INTERAÇÃO COM L. CHAGASI IN VITRO.....	58
5.3 – INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS MHC CLASSE II E CD14 EM MONÓCITOS PROVENIENTES DO SANGUE PERIFÉRICO.....	60
5.4 – INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS NAS SUBCLASSES DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E CD8 ⁺ , NO SANGUE CIRCULANTE.	61
5.5 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO BAÇO E NO FÍGADO.....	62
5.6 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO LINFONODO CERVICAL.....	64
5.7 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NA MEDULA ÓSSEA.....	64
5.8 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NA PELE.....	65
6- CONCLUSÕES.....	68
7- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	69
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
9- ANEXOS.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903; SUNDAR & RAI, 2002). Esses parasitos possuem ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados, na forma amastigota e em insetos vetores - dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo e *Phlebotomus* – no Velho Mundo, na forma promastigota (LAINSON et al., 1987; KILLICK-KENDRICK, 1990).

O ciclo biológico do parasito inicia-se no momento em que fêmeas do inseto vetor, ao fazerem o repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingerem macrófagos-monócitos contendo amastigotas. Essas amastigotas, na luz do trato digestivo, diferenciam-se em formas flageladas denominadas promastigotas procíclicas. As formas promastigotas multiplicam-se por divisão binária no trato digestivo do inseto e possuem uma camada de moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, consistindo de um núcleo glicano, uma âncora lipídica altamente conservada e unidades variáveis de oligossacárides. Interações envolvendo LPG com lectinas e moléculas tipo lectinas presentes no intestino do inseto, impedem que as formas promastigotas procíclicas sejam eliminadas juntamente com o bolo alimentar. Durante a metaciclogênese, essas formas sofrem uma extensa modificação estrutural, envolvendo o tamanho e a expressão de açúcares de LPG, transformando-se em promastigotas metacíclicas. A expressão de grande quantidade de LPG, bem como de outros glicoconjugados, como a metaloprotease - gp63, na superfície do parasito é capaz de protegê-lo da ação das enzimas hidrolíticas presentes no intestino do flebotomíneo (KILLICK-KENDRICK, 1990; ALEXANDER et al., 1999). As promastigotas metacíclicas apresentam reduzida afinidade de ligação às lectinas, levando ao desligamento do epitélio intestinal e migração para a probóscida do inseto. Durante o próximo repasto sangüíneo, a forma infectiva é passada para o hospedeiro vertebrado, sendo então internalizada pelos macrófagos, processo este, mediado por receptores (CUNNINGHAM, 2002; De ALMEIDA, 2003). As promastigotas se diferenciam em formas amastigotas nos fagolisossomas. Dentro das células do sistema monocítico-mononuclear (SMM) as amastigotas multiplicam-se por divisão binária. O processo ininterrupto de divisão rompe, eventualmente, o macrófago infectado liberando as amastigotas, que são capazes de infectar novas células. O flebotomíneo, ao fazer novo repasto sangüíneo, ingere os macrófagos infectados, perpetuando, assim, o ciclo.

As leishmanioses são consideradas endêmicas em 88 países de ambos, Velho e Novo Mundo. São causadas por diferentes espécies de *Leishmania* e constituem-se predominantemente zoonoses de animais silvestres, incluindo roedores, marsupiais, desdentados, canídeos e o homem.

A Organização Mundial de Saúde estima que a incidência anual da doença seja em torno de 12 milhões de casos em todo o mundo e que 350 milhões de pessoas apresentam o risco de adquirir uma das formas da doença. Por esta razão, as leishmanioses encontram-se entre as seis doenças infecciosas tropicais de grande importância na Saúde Pública (DESJEUX, 2004).

Em humanos, a infecção causada por *Leishmania* resulta em doença de amplo espectro dependendo da espécie envolvida e da eficiência da resposta imune do hospedeiro contra o parasito (TURK & BRYCESON, 1971). O quadro clínico da leishmaniose compreende formas cutâneas localizadas ou difusas, cutâneas disseminadas, mucocutâneas e formas viscerais. Entre as reconhecidas formas clínicas de apresentação, a Leishmaniose Visceral (LV) é a mais grave, progressiva e quase sempre fatal quando não tratada (BRYCESON, 1996).

A LV ocorre em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo, distribuída em todos os continentes, a exceção da Oceania e Antártica onde apresenta aspectos epidemiológicos variados (WHO, 2004). A LV humana (LVH) também conhecida como calazar pode ser causada por três espécies do parasito. A espécie *L. (Leishmania) donovani* (LAVERAN & MESNIL, 1903) é responsável pela doença na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kênia. Nestas regiões o homem atua como reservatório do parasito tendo a doença um perfil antroponótico (TAVARES et al., 2003). Já a espécie *L. (L.) infantum* (NICOLLE, 1908), agente etiológico da leishmaniose visceral na Ásia Central e sudoeste, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea tem caráter zoonótico. No Novo Mundo a espécie *L. (L.) chagasi* (CUNHA E CHAGAS, 1937) é o agente da LV que apresenta, também, caráter zoonótico. Estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e *L. infantum* como sendo uma única espécie (MAURÍCIO et al., 2000). Shaw (2007) sugere o uso do nome *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* para o agente etiológico da leishmaniose visceral americana. Como não existe ainda um consenso a respeito desse assunto, neste trabalho optou-se pela denominação *L. chagasi* ao parasito em questão, por se tratar de estudo realizado no Brasil.

As estimativas mundiais, em relação à LV, indicam que cerca de 200 milhões de pessoas encontram-se sob risco de adquirir a infecção e que 500 mil pessoas se infectam a cada ano. No ano de 2000 foram estimadas, na população mundial, 41 mil mortes causadas pela doença (GUERIN, et al., 2002). Aproximadamente 90% dos casos mundiais de LVH estão notificados em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (GUERIN, et al., 2002; WHO, 2004).

A emergência da LV, como um crescente problema de Saúde Pública, deve-se principalmente a fatores demográficos e ecológicos. Na América Latina a leishmaniose visceral está presente em locais onde anteriormente não ocorria. Na América do Sul, especialmente no Brasil, Colômbia e Venezuela, a migração e urbanização contribuem fortemente para o aumento da doença. As precárias condições sanitárias e nutricionais da população migrante, a presença de animais domésticos, atuando como reservatórios do parasito além de fonte alimentar para os flebotomíneos, no domicílio e peridomicílio e a capacidade de adaptação do vetor ao ambiente urbano são fatores fundamentais no estabelecimento e expansão da doença (WHO, 2004).

No Brasil, a incidência de LVH aumentou de 1977 casos em 1998 para 3624 casos em 1999 chegando a 4858 casos em 2000. Entretanto, após este período, observou-se uma diminuição na incidência de LVH no país, com 3203 casos em 2005. A leishmaniose visceral tem maior taxa de incidência nas regiões Nordeste e Norte, tendo crescido em todas as regiões (com exceção da região Nordeste) no período de 1990 a 2005, o que sugere que a doença encontra-se em expansão. Em número de casos, a região Nordeste concentrou, na década de 90, quase 90% dos casos do Brasil. Esta participação tem diminuído na década atual, chegando a 55% de casos da doença, seguida pelas regiões Sudeste (21,5%) e Norte (15,9%), em 2005. O aumento do número de casos nas demais regiões tem limitado a queda das taxas nacionais. (BRASIL-Ministério da Saúde, 2006).

Em Belo Horizonte – Minas Gerais, o número de casos de leishmaniose vem crescendo a cada ano (MARGONARI et al., 2006). Em 2006 foram relatados 113 casos de LVH com 10 óbitos e 8000 casos de leishmaniose visceral canina (LVC) (Secretaria Municipal de Saúde - Belo Horizonte, 2007).

1.2 - Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Estudos pioneiros realizados por CHAGAS et al. (1937 e 1938), na região Norte do Brasil, mostraram a existência de cães naturalmente parasitados, em paralelo à infecção humana. Todavia, a leishmaniose canina no Brasil só teve relevância quando foi estudada em uma área de grande endemicidade: o nordeste brasileiro. No Ceará, DEANE (1955), em estudo comparativo entre a infecção humana e canina, encontrou o parasito na pele de 16,3% dos indivíduos e em 77,6% dos cães naturalmente infectados. Além disso, verificou que a infecção experimental de flebotomíneos era mais freqüente e intensa quando os insetos se alimentavam em cães (75%) do que em humanos (28,5%). Estas observações, bem como as de outros trabalhos que têm estudado a doença canina em áreas endêmicas de LVH, mostram o cão como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos. Isto se deve a alta prevalência da doença no animal nessas

regiões e à presença do parasito na pele do cão, o que favorece a infecção do inseto vetor e, conseqüentemente, a transmissão ao homem (BRENER, 1957; ALENCAR, 1959; DEANE & DEANE, 1962; IVERSSON et al., 1983; MARZOCHI, et al., 1985).

O espectro patológico da LVC é muito diverso devido às diferenças na relação parasito-hospedeiro em conseqüência das variações na resposta imune individual do hospedeiro. Os sinais clínicos e o tempo de aparecimento da doença são variáveis oscilando entre ausência total de sinais até síndrome clínica severa. São sinais de LVC: febre, descamação e eczema, principalmente no focinho e orelha, pêlo opaco e ulcerações leves localizadas freqüentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações, úlcera de decúbito. Com grande freqüência observa-se, nas fases mais adiantadas da doença, esplenomegalia, alopecia generalizada, ulcerações mais acentuadas na pele, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarréia, melena ou hematoquesia, edema das patas, vômito, além do aparecimento de áreas de hiperqueratose especialmente na ponta do focinho. Na fase final da infecção ocorrem, em geral, paraparesia, caquexia, inanição e óbito do animal (DEANE & DEANE, 1955; ALENCAR, 1959; SLAPPENDEL & GREENE, 1990; GENARO, 1993; CIARAMELLA, 1997; ALVAR, 2004; COSTA VAL et al., 2004).

As principais lesões da LV, observadas em cães no Velho e Novo Mundo, ocorrem nos órgãos mais ricamente parasitados como baço, fígado, linfonodos, medula óssea e a pele.

O baço pode apresentar tamanho normal, discretamente aumentado ou hipertrofiado (FAURE-BRAC, 1933; DONATIEN & LESTOQUARD, 1935; ALENCAR, 1959). Neste órgão ocorre diminuição do número de linfócitos e proliferação de macrófagos na bainha linfóide periarteriolar, hiperplasia folicular e aumento da polpa vermelha com agregados de macrófagos e células plasmáticas (KEENAN et al., 1984; GENARO, 1993; TAFURI et al., 1996).

No fígado, observa-se infiltrado plasmolinfocitário e hiperplasia das células de Küpffer. Pode ocorrer uma reação inflamatória exsudativa com infiltrado linfoplasmocitário nos espaços portais e interlobulares, além da presença de granulomas intralobulares, com células epitelióides, parasitados ou não (GENARO, 1993; TAFURI et al., 1996; TAFURI et al., 2001).

Nos linfonodos, o aumento do número e tamanho dos folículos linfóides e a marcante hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos medulares (cordões e seios) justificam a linfadenopatia observada clinicamente (LIMA et al., 2004).

A medula óssea encontra-se hiperplásica, devido a hiperplasia da série monocítica e hipoplasia da série granulocítica (KEENAN et al., 1984).

Na pele, observa-se processo inflamatório plasmohistiolinfocitário com graus variados de intensidade podendo apresentar-se distribuído ao redor dos anexos ou difusamente na derme (SANTOS et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2006). Acantose,

hiperceratose com presença ou não de pérolas córneas, paraceratose e degenerações celulares são alterações histopatológicas comumente observadas na leishmaniose visceral canina.

O envolvimento renal, glomerulonefrite causada pela deposição de imunocomplexos, é freqüente e os sinais clínicos apenas se tornam evidentes quando a lesão renal já é grave. Em alguns casos a insuficiência renal é o único sintoma observado e nestes casos o óbito pode ocorrer em poucos dias (MARCUSSEN et al., 1989; NIETO et al., 1992; TAFURI et al., 1996; FONT & CLOSA, 1997; CIARAMELLA et al., 1997).

Nos pulmões ocorre pneumonite intersticial crônica com espessamento dos septos interalveolares (TRYPHONAS et al., 1977; ANDERSON, 1980; DUARTE et al., 1986; GONÇALVES, 2003).

No intestino a hiperplasia linfóide das placas de Payer, associada ou não ao parasitismo, pode ocorrer nos intestinos delgado, jejuno e íleo, grosso, ceco e cólon (TOMÉ, 1956; BRENER, 1957; KEENAN et al., 1984; SILVA et al., 2001).

1.3 - Interação *Leishmania* hospedeiro vertebrado

A interação *Leishmania*-macrófago envolve mecanismos complexos, dependentes de fatores múltiplos dos hospedeiros vertebrados e invertebrados, bem como do próprio parasito. O sucesso da infecção em ambos os hospedeiros não ocorre ao acaso. De acordo com Killick-Kendrick (1979), os vetores dos parasitos do gênero *Leishmania* são específicos, bem definidos e variações nas moléculas de superfície dos protozoários facilitam o sucesso da infecção no vetor apropriado (SCHLEIN, 1993). O hospedeiro vertebrado, por sua vez, possui mecanismos de defesa que são ativados na presença do parasito. Sabe-se que os macrófagos são as células hospedeiras primárias das promastigotas, o que significa que esses parasitos possuem mecanismos de adaptação aos fatores hostis do hospedeiro, antes, durante e após sua internalização na célula (RUSSEL & TALAMAS-ROHANA, 1989; OLIVIER et al., 2005).

Durante o repasto sangüíneo, a fêmea hematófoga (vetor) introduz a proboscida no hospedeiro vertebrado dilacerando proteínas estruturais da matriz intersticial, inclusive atingindo a parede de pequenos vasos sagüíneos, promovendo lesões hemorrágicas. A formação dessas lesões decorre tanto da ação mecânica da proboscida, quanto da ação da saliva do inseto. De fato, componentes da saliva como maxadilina - potente agente vasodilatador e imunomodulador, adenosina, prostaglandinas, dentre outros, auxiliam o vetor na aquisição do sangue. Por outro lado, ocorre a ativação de mecanismos de defesa natural, no hospedeiro, como o sistema do complemento, trombina, plaquetas, anticorpos naturais, fagócitos, dentre outros (RIBEIRO et al.,

1987; GILLESPIE et al., 2000). A sobrevivência do parasito, na sua forma infectante, é fortemente influenciada pelos elementos presentes nesse microambiente tecidual.

Leishmania é capaz de ativar o complemento, tanto pela via clássica quanto pela via alternativa (PEARSON & STEIGBIGEL, 1980; MOSSER & EDELSON, 1985; PUENTES et al., 1989). Entretanto, o complemento não consegue lisar o parasito devido à presença de moléculas de LPG e gp63 na superfície das promastigotas metacíclicas que impedem, por ação espacial, a inserção do complexo lítico C5-9 (HALL & JOINER, 1991). Porém, os fatores sorológicos do complemento apresentam grande importância na interação parasito-hospedeiro. Os produtos de clivagem do complemento (C3a, C5a) são potentes fatores quimiotáticos. Bray (1983) observou que a promastigota por si só não faz quimiotaxia para macrófagos, mas sim indiretamente, pela ação do complemento (C5a). Este é capaz de atrair monócitos-macrófagos ao foco inflamatório provocado pela picada do flebotomíneo. Entretanto, há que se ressaltar o papel das opsoninas, especialmente C3 e seus produtos de clivagem, C3b, C3bi e C3dg. Estes, ao opsonizarem o parasito, facilitam o processo de fagocitose mediada por receptores específicos, presentes na superfície dos macrófagos (ROSS, 1980; ROSS & MEDOF, 1985; LAMBRIS, 1988,; KANE & MOSSER, 2000).

Os macrófagos contêm, em sua superfície, um complexo arranjo de receptores capazes de mediar a ligação de uma ampla diversidade de ligantes. Dentre eles destacam-se os receptores pertencentes à família das integrinas $\beta 2$ que parecem ter importância fundamental na interação *Leishmania*-macrófagos (TALAMAS-ROHANA et al., 1990; MOSSER & ROSENTHAL, 1993; CUNNINGHAM, 2002; HANDMAN & BULLEN, 2002; De ALMEIDA et al., 2003).

As integrinas são moléculas de adesão cujas funções envolvem interações célula-célula ou célula-matriz extracelular, fundamentais para a ativação leucocitária (SPRINGER, 1990; PATARROYO et al., 1990). As integrinas $\beta 2$ específicas de leucócitos (CD11/CD18), consistem de três heterodímeros com cadeias α específicas (CD11a,b,c) e uma cadeia β comum (CD18).

A integrina CD11a/CD18, também conhecida como antígeno 1 associado à função do linfócito (LFA-1) é encontrada principalmente em leucócitos mononucleares. Inicialmente o LFA-1 foi caracterizado em linfócitos T, mas também se encontra presente em linfócitos B, exercendo papel importante na apresentação de antígeno (SPRINGER, 1990; BACHMANN et al., 1997; NICOLLS & GILL, 2006). A ligação de LFA-1 com moléculas de adesão intercelulares, ICAM-1, aumenta a eficiência da apresentação de antígenos para os linfócitos B devido principalmente à ativação de linfócitos T (HOWARD et al., 1986; MOY & BRIAN, 1992). LFA-1 é a principal integrina envolvida na migração transendotelial de leucócitos, tanto na recirculação normal de linfócitos pelos linfonodos quanto na resposta de células linfocíticas e mielóides a sinais inflamatórios. O bloqueio de LFA-1 altera a capacidade de migração dos linfócitos através da

superfície endotelial. Em camundongos deficientes de LFA-1, neutrófilos e linfócitos T ativados apresentaram-se inábeis em atravessar a barreira de células endoteliais em resposta a um gradiente de quimiocinas (ANDREW et al., 1998). Esse receptor também tem um importante papel na sinapse imunológica que se forma entre linfócitos T e células apresentadoras de antígenos durante a resposta imunológica (HOGG et al., 2002; PEREZ et al., 2003; NICOLLS & GILL, 2006).

A integrina CD11b/CD18, conhecida como receptor para o terceiro fator do complemento (CR3) ou MAC-1, é um receptor heterodimérico expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células natural killer. A função do CR3 foi inicialmente descrita como a habilidade de se ligar à forma inativa do complemento C3bi, mediando desta forma, a fagocitose e lise de eritrócitos opsonizados com este fator, além de aumentar a atividade das células natural killer contra células alvos opsonizadas com C3bi (ROTHLEIN & SPRINGER, 1985; RAMOS et al., 1988).

CR3 interage com moléculas de ICAM-1, mediando interações célula-célula e célula-matrix extracelular, importantes na adesão e migração de células para o foco inflamatório. Este receptor pode interagir também com vários ligantes solúveis incluindo moléculas como fibrinogênio, fator X da cascata da coagulação; sacarídeos e polissacarídeos presentes na superfície de vários microorganismos (ARNAOUT et al., 1983; WRIGHT et al., 1983; WRIGHT & JONG, 1986; RUSSEL & WRIGHT, 1988; WRIGHT et al., 1988; ALTIERI & EDGINGTON, 1988; WRIGHT et al., 1989; ALTIERI et al., 1990; TALAMAS-ROHANA et al., 1990; DIAMONT et al., 1991). CR3 está envolvido em várias funções de monócitos e macrófagos incluindo a adesão transmigração e fagocitose (CUNNINGHAM, 2002; De ALMEIDA et al., 2003; OLIVIER et al., 2005). Marth & Kelsall (1997) demonstraram a habilidade dos ligantes naturais de CR3 em suprimir a produção de interleucina 12 (IL-12). Essa supressão parece estar relacionada com a indução de uma cascata de sinalizações que regulam negativamente as vias de transcrição e transdução (McDOWELL & SACKS, 1999).

A opsonização do parasito com C3b e, principalmente com C3bi que se liga ao receptor CR3, parece ser o principal meio de ligação entre as promastigotas metacíclicas e os macrófagos do hospedeiro. A internalização do parasito via CR3 aumenta sua sobrevivência no macrófago, uma vez que CR3 promove fagocitose de *Leishmania* sem induzir a explosão respiratória (MOSSER et al., 1985; MOSSER & ROSENTHAL, 1993; GONÇALVES et al., 2005). Outro benefício da utilização desse receptor é a inibição da imunidade celular mediada por IL-12, que leva à proteção da promastigota (CUNNINGHAM, 2002).

A integrina CD11c/CD18, conhecida, também, como p150,95 ou CR4, é encontrada em macrófagos. Os ligantes para este receptor não são bem conhecidos. Sabe-se que CD11c/CD18 se liga ao fibrinogênio e à forma inativa do terceiro fator do complemento (C3bi) sendo, portanto,

considerada um receptor para o complemento, embora seu aspecto funcional não esteja ainda totalmente elucidado (MYONES et al., 1988; POSTIGO et al., 1991).

A ligação *Leishmania*-macrófagos pode se dar, portanto, de maneira direta ou indireta, envolvendo moléculas específicas, já mencionadas, presentes na superfície de ambos, que estimulam o processo de internalização (CHANG, 1979).

Na interação direta, moléculas do parasito ligam-se aos receptores presentes na superfície dos macrófagos: LPG liga-se aos receptores CR3 e CR4 (TALAMAS-ROHANA et al., 1990); gp63 liga-se ao receptor CR3 (RUSSEL & WRIGHT, 1988) e alguns carboidratos ligam-se aos receptores de manose e fucose (MOSSER, 1993; BASU & RAY, 2005).

Na interação indireta, a opsonização do parasito, com os elementos presentes no soro do hospedeiro como imunoglobulinas, fibronectina e fatores do complemento, facilita sua internalização, através da ligação com receptores específicos presentes no macrófago, mediando assim, a sobrevivência da *Leishmania*. Dentre os receptores macrofágicos deve-se ressaltar aqueles pertencentes à família das integrinas $\beta 2$, em especial o receptor CR3 (MOSSER, 1993). A importância destes receptores na adesão promastigota-macrófago depende da espécie de *Leishmania* envolvida. De acordo com Mosser e Rosenthal (1993), para a interação de promastigotas de *L. major* e *L. enrietti* são necessários componentes do complemento, enquanto *L. amazonensis* adere eficientemente a macrófagos de camundongo na ausência do soro. Na adesão da *L. donovani* a macrófagos humanos, os receptores macrofágicos para manose são importantes (JENEFER et al., 1985; WILSON & PEARSON, 1988).

A natureza dos macrófagos pode ser outro fator importante nessa interação com o parasito. Mosser & Rosenthal (1993) consideram, em geral, que macrófagos humanos derivados de monócitos interagem pouco com promastigotas não opsonizadas, quando comparados a macrófagos peritoneais murinos. Além disso, macrófagos de camundongos obtidos da medula óssea aderem aos parasitos de maneira ainda mais intensa.

Existem ainda poucos estudos sobre a importância dos receptores, pertencentes à família das integrinas $\beta 2$, na leishmaniose visceral canina (TAFURI et al., 1996; SANCHEZ et al., 2004). Gonçalves et al. (2005) demonstraram a importância do CR3 na interação parasito-hospedeiro em macrófagos peritoneais. Recentemente, Sampaio et al (2007) obtiveram resultados semelhantes ao estudarem monócitos e macrófagos derivados de monócitos de cães naturalmente e experimentalmente infectados. Entretanto, mais estudos se fazem necessários para o melhor entendimento do papel dos receptores CD11a,b,c/CD18 nessa interação, bem como a influência do tratamento na expressão destes receptores nos monócitos-macrófagos caninos.

1.4 – Resposta imune

Na leishmaniose a resposta imune protetora é mediada pela imunidade celular. A resposta imune humoral do hospedeiro não é competente para eliminar o parasito, pois esse se encontra dentro dos fagolissosomas dos macrófagos. Os fagócitos mononucleares constituem importantes componentes da imunidade mediada por células. Dentre suas funções podemos citar a produção de enzimas proteolíticas e outras substâncias que exibem efeitos microbicidas, a produção de mediadores solúveis (citocinas) que possuem efeito imunorregulador e o processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4⁺, associados às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal da classe II – MHC classe II (CUNNINGHAM, 2002).

A habilidade para processar os antígenos e apresentá-los na superfície celular é um importante aspecto da imunidade inata no combate à infecção (MURRAY, 2000; GOMES-PEREIRA, 2004). Em geral, antígenos presentes no compartimento endo/fagocítico são apresentados juntamente com MHC classe II aos linfócitos T CD4⁺, ao passo que, antígenos presentes no citoplasma são levados ao retículo endoplasmático e apresentados, na superfície da célula, juntamente com MHC classe I aos linfócitos T CD8⁺. Entretanto, observou-se que alguns patógenos intracelulares, inclusive *Leishmania*, estimulam uma resposta imune, mediada por linfócitos T CD8⁺, dependente de MHC classe I, processo este denominado apresentação cruzada (RODRIGUES et al., 2003; BASU & RAY, 2005). Alguns estudos têm mostrado que a *L. donovani* inibe a apresentação de antígenos através da inibição da expressão de genes de MHC classe II (REINER et al., 1987; De ALMEIDA et al., 2003). Por outro lado, macrófagos infectados com *L. amazonensis* expressaram níveis normais de MHC classe II (LANG et al., 1994).

A resistência às infecções causadas por *Leishmania* está associada à capacidade dos linfócitos T CD4⁺ de produzir interferon gama (IFN- γ), que ativa os macrófagos, estimulando o aumento da produção de reativos intermediários de oxigênio, responsáveis pela morte intracelular do parasito (LIEW et al., 1989; ROSA, 2006). Adicionalmente, existem estudos que afirmam o papel dos linfócitos T CD8⁺ na resistência à infecção por *Leishmania* (HILL et al., 1989; MULLER et al., 1991). Estas células têm sido implicadas no controle da LV por participarem da resposta imune adquirida específica desenvolvida pelo hospedeiro (GOMES-PEREIRA et al., 2004).

Na leishmaniose ocorre diminuição da resposta imune celular específica, devido, em parte, à queda do número de linfócitos T CD4⁺, responsável pela patogênese e progressão da doença. Bourdoiseau et al. (1997) observaram que cães naturalmente infectados com doença ativa apresentavam percentual de linfócitos T CD4⁺ significativamente menor do que os cães não infectados. Reis (2001) ao estudar as diferentes formas clínicas da infecção natural observou que

cães sintomáticos apresentaram diminuição nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, sugerindo deficiência de resposta celular antígeno-específica.

A importância dos linfócitos T CD4⁺ na LVC também foi constatada por Alvar et al. (2004) ao observarem correlação direta entre os níveis de linfócitos T CD4⁺ e a resposta ao tratamento quimioterápico, em cães naturalmente infectados. Outro aspecto importante do papel decisivo dos linfócitos T CD4⁺ no controle do parasito, é a observação de que a diminuição destas células se correlaciona com o aumento da capacidade infectiva dos cães para os flebotomíneos durante a evolução da doença (GUARGA et al., 2002).

O papel dos linfócitos T CD8⁺ na LVC ainda não está tão bem estabelecido como no modelo murino. Neste modelo, sua importância depende da espécie estudada. Em camundongos BALB/c os linfócitos T CD8⁺ são de grande importância no controle da doença, entretanto em camundongos C57BL/6, embora ativados, parecem não ter papel relevante no controle do parasito (TSAGOZIS et al. 2005).

1.5 – Tratamento da LVC

O tratamento da leishmaniose visceral canina vem sendo estudado por vários pesquisadores, desde a descoberta de que as leishmanioses humana e canina são causadas pelo mesmo agente. Entretanto, as drogas antileishmanicidas usadas com sucesso na terapia em humanos, como os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e miltefosine, têm se mostrado de eficácia controversa no tratamento da LVC. Em cães, as drogas induzem uma remissão temporária dos sinais clínicos, nem sempre previnem a ocorrência de recidivas e, freqüentemente, causam vários efeitos colaterais. Adicionalmente, têm efeito limitado na infectividade de flebotomíneos, levando ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas (BANETH & SHAW, 2002; OLIVA et al., 2004).

Os compostos antimoniais pentavalentes são os principais medicamentos usados na terapia humana e canina. A dosagem de antimoniais utilizada no tratamento canino é aproximadamente 10 vezes maior que o recomendado para o tratamento humano. O mecanismo de ação dessas drogas ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, sabe-se que elas atuam na inibição seletiva de enzimas do parasito, requeridas na via glicolítica e na oxidação de ácidos graxos.

Devido ao risco de desenvolvimento de resistência do parasito aos antimoniais, a Organização Mundial de Saúde, não recomenda a terapia antimonial convencional. No Brasil, o Ministério da Saúde proíbe o uso de N-metil glucamina no tratamento canino conforme parecer nº 0299/2004 da Advocacia Geral da União.

Diante deste contexto, a obtenção de novas drogas ou novas formulações para drogas que possam determinar cura completa para os cães infectados continua sendo um dos grandes desafios para o controle da doença (SCHETTINI et al., 2003). Neste sentido, os lipossomas representam uma estratégia promissora, pois, esse sistema carreador de fármaco aumenta consideravelmente a eficácia das drogas.

Os lipossomas são vesículas artificiais compostas por bicamadas concêntricas lipídicas separadas por compartimentos de água. Essas bicamadas são compostas por moléculas como fosfatidil-colina, colesterol e diesteroil-fosfatidil-glicerol contendo uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica (BAGNHAM, 1992). Os lipossomas podem diferir em tamanho (diâmetro de 20 nm, 1 µm ou maiores), composição e organização estrutural (vesículas: uni, oligo ou multilamelares). Os solutos podem ser encapsulados no compartimento aquoso (solutos polares) ou no compartimento lipídico (solutos lipofílicos) (FRÉZARD, 1999)

As propriedades dos lipossomas, e sua subsequente aplicabilidade dependem de suas características físicas e das características fisicoquímicas da membrana lipossomal (FRÉZARD, 1999). Grande parte do conhecimento a cerca da atividade dos lipossomas “*in vivo*” foi obtido utilizando-se injeções intravenosas. Os lipossomas administrados intravenosamente normalmente interagem com dois grupos distintos de proteínas plasmáticas: as lipoproteínas de alta densidade e as chamadas opsoninas que, por adsorverem-se na superfície das vesículas, medeiam sua endocitose pelos macrófagos. A taxa de desaparecimento dos lipossomas do sangue circulante depende da habilidade de ligação das opsoninas com a superfície do lipossoma (GREGORIADIS, 1990); das características da superfície dos lipossomas, bem como, do tamanho das vesículas (LIU & LIU, 1996).

Os lipossomas representam um grande avanço no tratamento das doenças parasitárias, especialmente daquelas de etiologia intracelular que incidem sobre os componentes do sistema monocítico mononuclear (SMM), como é o caso da leishmaniose visceral. Estudos pré-clínicos realizados em animais experimentais demonstraram que o antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas foi 200 vezes mais ativo que a droga livre. O aumento espetacular da eficiência dos antimoniais, após sua administração na forma encapsulada em lipossomas, foi atribuído ao fato desse sistema de transporte ser rapidamente removido do compartimento vascular por células do SMM, mediante fagocitose (ALVING, 1986).

Frézard et al. (2000) desenvolveram um novo método para encapsulação do antimoniato de meglumina em lipossomas. Esse método permitiu a encapsulação do composto com maior eficiência que os métodos convencionais. Além disso, a formulação resultante não apresentou os problemas de estabilidade normalmente encontrados nas convencionais. Quando avaliada em hamsters infectados por *L. chagasi*, a preparação administrada em dose única induziu o

decréscimo médio de 50 vezes da carga parasitária no baço e fígado dos animais (FRÉZARD et al., 2000). Ao estudar a biodistribuição do antimônio em cães, após administração intravenosa dessa preparação em dose única, Schettini et al. (2003) observaram concentrações de antimônio no baço, fígado e medula óssea, sendo que as maiores concentrações foram observadas no baço e fígado. Estes autores sugerem que as baixas concentrações de Sb obtidas na medula podem estar relacionadas à dose utilizada ou ao tamanho das vesículas. Então, Schettini et al. (2005) avaliaram os efeitos farmacocinéticos e parasitológicos desta formulação, após administração de múltiplas doses em cães e concluíram que embora este protocolo de tratamento tenha sido capaz de aumentar os níveis de antimônio na medula, reduzir o número de animais positivos e reduzir a intensidade da infecção para *Lutzomyia longipalpis*, ele não foi capaz de eliminar completamente o parasito. Além disso, no momento da injeção dos lipossomas foram observados efeitos colaterais transitórios como taquicardia, sialorréia, bradicardia, defecação e cianose, os quais podem ser atribuídos ao tamanho elevado dos lipossomas utilizados e a uma conseqüente obstrução transitória dos capilares pulmonares. Diante deste quadro, Schettini et al (2006) desenvolveram uma nova formulação de antimônio encapsulado em lipossoma, consistindo de vesículas de tamanho nanométrico (4nm), que elevou a concentração do antimônio na medula óssea (aproximadamente 3 vezes) em relação à formulação com tamanho maior (1,4 µm).

Assim, esse trabalho visa avaliar o impacto do tratamento, com esta nova formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, em parâmetros imunológicos e histopatológicos, bem como na carga parasitária de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, submetidos a múltiplas doses desse fármaco.

Faz-se necessário ressaltar que o presente trabalho faz parte de um projeto mais amplo (multidisciplinar), realizado por pesquisadores de diferentes unidades da UFMG. Esse projeto além de avaliar os parâmetros acima mencionados, também teve por objetivo avaliar a biodistribuição do antimônio nos órgãos alvos, bem como, a toxicidade e a eficácia terapêutica da formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos no tratamento da LVC, tema da tese de doutorado defendida por Ribeiro (2007).

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar o impacto do tratamento com uma nova formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, em parâmetros imunológicos, histopatológicos, e na carga parasitária de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar os aspectos clínicos dos cães antes e após o tratamento.
- Avaliar a expressão de CD11a/CD18 (LFA-1); CD11b/CD18 (CR3), CD11c/CD18 (CR4), MHC classe II e CD14, em monócitos do sangue periférico, antes e após interação *in vitro* com *L. chagasi*, na presença e na ausência de soro de camundongo deficiente do fator 5 do complemento.
- Avaliar a frequência das subclasses de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico.
- Analisar a macroscopia das lesões do fígado, baço, linfonodo cervical e pele.
- Avaliar a histopatologia do baço, fígado, linfonodo cervical, medula óssea e pele.
- Avaliar o parasitismo no fígado, baço, linfonodo cervical, medula óssea e pele.
- Avaliar a expressão de CD11a e CD11b em fragmentos de baço, fígado, linfonodo cervical e pele.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados 36 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Santa Luzia, MG, Brasil, comprovadamente soro reativos para *L. chagasi* por meio de testes de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunoenensaio enzimático (ELISA - enzyme linked immunoabsorbent assay).

3.1.1 - Critérios de inclusão no estudo

Animais com ausência de outras infecções concorrentes e com exame parasitológico positivo (esfregaço medular ou mielocultura ou imuno-histoquímica de biópsia de pele da região da ponta da orelha).

3.1.2 - Manuseio dos animais

Os animais selecionados foram vermifugados com anti-helmíntico oral de largo espectro, em duas doses com intervalo de 15 dias, imunizados contra as principais patologias virais caninas (Cinomose, parvovirose, coronavirose, hepatite infecciosa canina, leptospirose canina, parainfluenza canina, adenovírus tipo 2 e raiva canina) e tratados com produtos tópicos de efeito antiektoparasitário prolongado (Top Line[®], Merial Saúde Animal).

Para receber os animais, o canil experimental do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) sofreu desinfecção (com Hipoclorito de Sódio a 1%) completa do ambiente num período anterior à chegada dos mesmos. Os grupos foram distribuídos em baias coletivas, respeitando a lotação máxima de 8 animais/baia, equipadas com comedouros e bebedouros automáticos contendo água potável e ração comercial balanceada fornecida “ad libitum”. As baias eram teladas e possuíam área coberta e descoberta, o que favorecia a incidência de luz solar. Estas foram diariamente higienizadas com Hipoclorito de Sódio a 1% e borrifadas trimestralmente com piretróides.

3.1.3 - Grupos Experimentais

Os cães foram organizados em três grupos com 12 animais cada. A distribuição dos grupos levou em consideração critérios de estratificação baseados no peso, sexo, idade aproximada e classificação clínica (segundo MANCIANTI et al., 1998), de modo a proporcionar homogeneidade entre os grupos. Cada grupo recebeu protocolo de tratamento distinto conforme especificado abaixo:

Grupo I (Lp-Sb): 12 animais que receberam antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (Schettini et al., 2006) em dose equivalente a 6,5 mg de Sb/kg, pela via endovenosa, em quatro aplicações com intervalos de 96 h.

Grupo II (Lp): 12 animais que receberam o lipossoma “vazio”, pela via endovenosa, em quatro aplicações com intervalos de 96 h.

Grupo III (C): 12 animais que receberam solução de salina estéril, pela via endovenosa, em quatro aplicações com intervalos de 96 h.

3.2 – Comitê de Ética Experimental Animal

Este projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, registrado sob o protocolo de número 166/05 (ANEXO 1).

3.3 – Análise fenotípica das células mononucleares do sangue periférico

3.3.1 – Coleta de sangue

O sangue foi coletado na região cervical, após anti-sepsia com álcool iodado a 70%, por venopunção jugular com agulha e seringa estéreis. Foram coletados 20 mL de sangue em heparina, 30 e 60 dias após o término do tratamento.

3.3.2 – Obtenção das células mononucleares

O sangue heparinizado foi diluído em PBS (na proporção 1:1). Esta mistura foi colocada sob uma mistura de Ficoll-Hypaque (Sigma 10077) na razão 1:3 (Ficoll-sangue), em tubos estéreis, de fundo cônico, de poliestireno (Falcon – Corning – EUA). Após centrifugação a 250g por 20 minutos a 18°C, o anel de células mononucleares que se formou na interface Ficoll-Hypaque – plasma foi coletado e colocado em outro tubo de Falcon estéril juntamente com 40 mL de PBS (10%) gelado. Este tubo foi centrifugado a 220g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 30 mL de água destilada estéril (solução de lise) por 45 segundos sob delicada homogeneização. Decorrido este tempo, 30 mL de PBS (30%) estéril foi acrescentado rapidamente e o tubo foi novamente centrifugado a 220g por 15 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas com 1 mL de meio RPMI. A concentração foi acertada para 5×10^6 células/mL, após contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer, com meio RPMI – 1640.

3.3.3 – Parasitos

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania (L) chagasi* (MHOM/BR/72/BH/46) na fase estacionária de crescimento em meio alfa-MEM (GIBCO) a 25 °C, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) inativado, glutamina (2mM), penicilina G (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL).

3.3.4 – Marcação dos Parasitos com CFSE

A promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, obtidas do cultivo, foram lavadas 3 vezes com PBS (10%) por centrifugação a 1200 g por 10 minutos a 4°C. Após a última centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de PBS (10%). Logo em seguida acrescentou-se 1µl de 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester - CFSE – (Molecular Probes C-1157) na diluição de 2,8 mg/mL em DMSO – Dimetil sulfóxido) e a suspensão foi mantida em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, protegida da luz. Os parasitos foram então lavados em 10 mL de PBS (10%) gelado + 10% de soro fetal bovino e centrifugados por 10 minutos a 250g. Ao pellet foi acrescido meio de cultura denominado “Phagocytosis Buffer” (PB) (partes iguais de Dulbecco’s Modified Eagle Médium – DMM e Meio 199 suplementado com 1% de BSA – solução de albumina bovina e 12,5 mM HEPES – N2 hidroxietilpiperazina – N2 ácido ethanosulfônico) para se obter uma concentração de 5×10^7 células/mL (GONÇALVES et al., 2005).

3.3.5 – Interação *Leishmania* e células mononucleares

A interação *Leishmania* marcadas com CFSE e os monócitos do sangue periférico foi realizada utilizando-se 50 µl da suspensão de células mononucleares (5×10^6 células/mL) e 50 µl da suspensão dos parasitos (5×10^7 células/mL). A mistura foi incubada por 45 minutos a 37°C na presença ou na ausência de soro de camundongo AKR/J, deficiente do fator C5 do complemento, para avaliar a importância dos fragmentos de C3b e C3bi na adesão das formas metacíclicas de *L. chagasi* nos monócitos (GONÇALVES et al., 2005).

3.3.6 – Anticorpos

Os anticorpos foram diluídos e marcados com fluorocromos (quando necessário) utilizando-se o Kit Zenon Tricolor (Molecular Probes – Z25080), conforme descrito pelo fabricante. As diluições e marcações de cada anticorpo estão descritas no QUADRO 1.

QUADRO 1

Anticorpos utilizados na fenotipagem das células sanguíneas

Anticorpo	Diluição	Fluorocromo	Marca
Mouse anti canine CD11a	1/100	Cy5 *	MCA 80A488 – Serotec
Mouse anti canine CD11b	1/100	Cy5 *	MCA 1777S – Serotec
Mouse anti canine CD11c	1/100	PE *	MCA 1778S – Serotec
Mouse anti human CD14	1/100	Cy5	MCA 1568C - Serotec
Mouse anti canine MHC II	1/20	PE *	MCA 2037S – Serotec
Rat anti canine CD4	1/40	PE	MCA 1038PE – Serotec
Mouse anti canine CD8	1/40	FITC	MCA 1039F – Serotec

* Anticorpos marcados com fluorocromo utilizando-se o kit Zenon tricolor (Molecular Probes – Z25080)

3.3.7 – Interação suspensão *Leishmania*-células mononucleares e anticorpos específicos

A suspensão de *Leishmania*-células mononucleares foi distribuída em placas de ELISA com fundo em U. Cada poço recebeu 100µl da suspensão de células e 100µl de PBS (10%). A placa foi então centrifugada por 7 minutos, 150g, 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado no “vortex”. Em cada poço foram acrescentados 20µl do anticorpo a ser testado previamente diluído em ADS (solução diluidora de anticorpos). A placa foi então incubada por 20 minutos, a 4°C ao abrigo da luz. Logo após acrescentou-se 150 µl de PBS (10%) e a placa foi novamente centrifugada por 7 minutos, 150g, a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi desprezado e após agitação no vortex acrescentou-se 100 µl de PBS (10%) e 100 µl de formaldeído (4% em PBS). O conteúdo da placa foi transferido para tubos apropriados para leitura no citômetro de fluxo equipado com laser emitindo a 488nm (FACS Vantage, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA). As células foram separadas levando-se em conta o tamanho, a granulidade e a fluorescência emitida pelos anticorpos monoclonais específicos. Os resultados foram, então, analisados e processados utilizando-se o software WinMDI, versão 2.8 (Joseph Trotter: <http://facs.scripps.edu/software.html#winapps>) (GONÇALVES et al., 2005).

3.3.8 – Avaliação da expressão do receptor CD11a/CD18 na superfície dos monócitos

O *gate* de monócitos foi selecionado em R1 (vermelho). A expressão de CD11a foi avaliada através da fluorescência emitida pelos anticorpos específicos marcados com Cy e as formas promastigotas de *Leishmania* foram detectadas de acordo com a intensidade da fluorescência emitida pelo CFSE, conforme observado na FIG. 1.

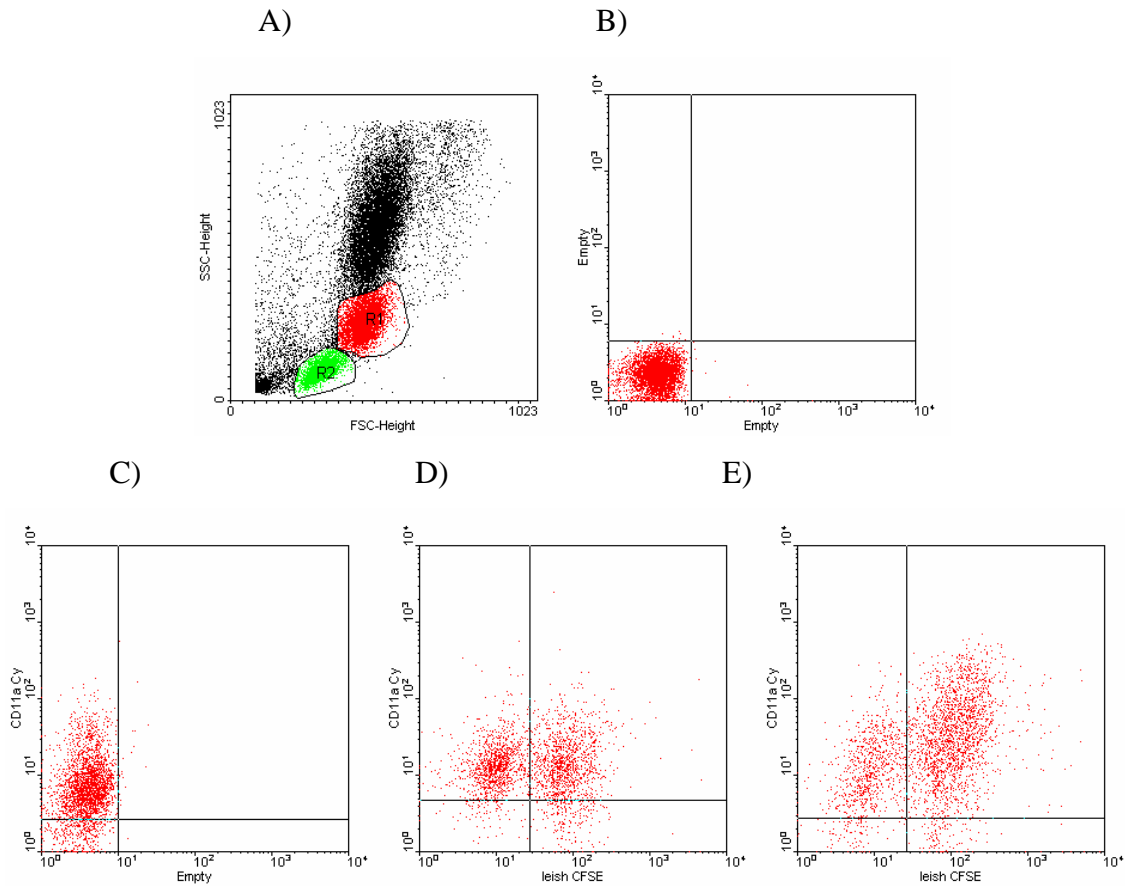


FIGURA 1 – Análise da expressão de CD11a em monócitos – Citometria de fluxo. A) Separação das células por tamanho e granulação. Monócitos em R1. B) *Gate* de monócitos sem marcação (controle). C) Expressão CD11a em monócitos. D) Expressão de CD11a em monócitos após interação com *Leishmania chagasi in vitro* E) Expressão de CD11a em monócitos após interação com *Leishmania chagasi in vitro* na presença de soro de camundongo deficiente de fator 5 do complemento.

3.3.9 – Avaliação da expressão do receptor CD11b/CD18 na superfície dos monócitos

A expressão de CD11b em monócitos foi avaliada seguindo protocolo semelhante ao utilizado para CD11a (FIG. 2).

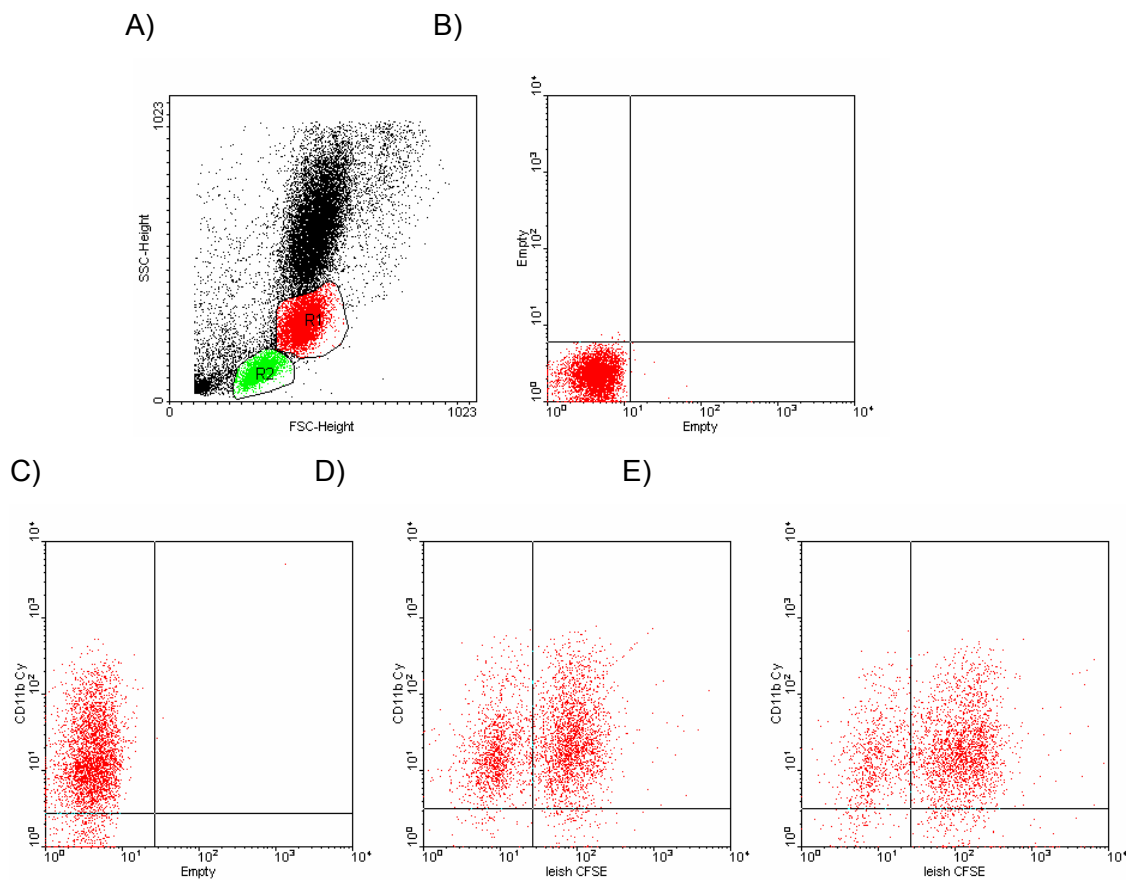


FIGURA 2 - Expressão de CD11b em monócitos – Citometria de fluxo. A) Separação das células por tamanho e granulação. Monócitos em R1. B) Gate de monócitos sem marcação (controle). C) Expressão CD11b em monócitos. D) Expressão de CD11b em monócitos após interação com *Leishmania chagasi in vitro*. E) Expressão de CD11b em monócitos após interação com *Leishmania chagasi in vitro* na presença de soro de camundongo deficiente de fator 5 do complemento.

3.3.10 – Avaliação da expressão de moléculas de MHC classe II e moléculas de CD14 na superfície dos monócitos.

A expressão de moléculas de MHC classe II e de CD14 na superfície dos monócitos foi determinada utilizando-se anticorpos específicos marcados com PE e Cy5, respectivamente, conforme observado na FIG. 3.

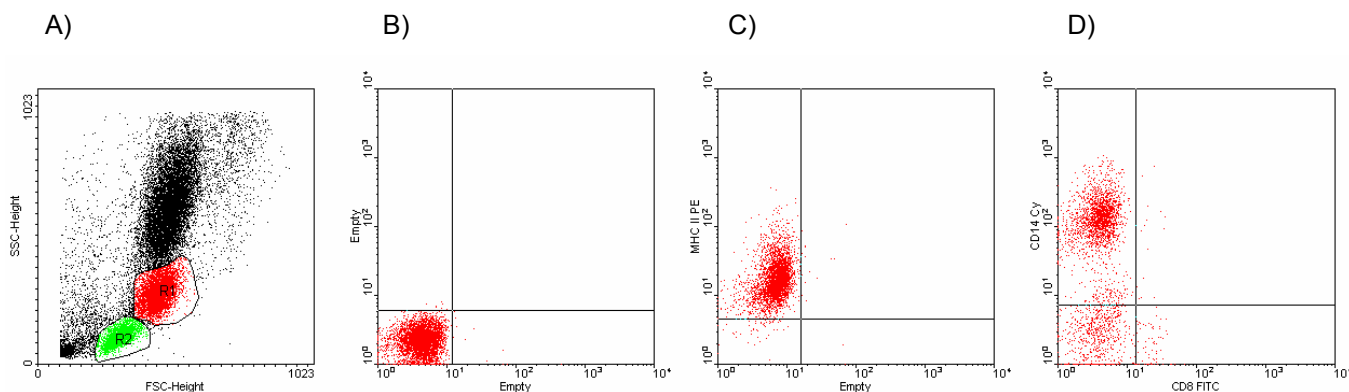


FIGURA 3 - Expressão de MHC classe II e CD14 em monócitos - Citometria de fluxo. A) Separação das células por tamanho e granulação. Monócitos em R1, B) Gate de monócitos sem marcação (controle), C) Expressão de MHC classe II na superfície dos monócitos, D) Expressão de CD14 na superfície dos monócitos.

3.3.11 – Frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico

A frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ presentes no sangue periférico foi determinada utilizando-se anticorpos anti-CD4 marcados com PE e anti-CD8 marcados com FITC. O gate de linfócitos foi selecionado em R2, conforme observado na FIG. 4.

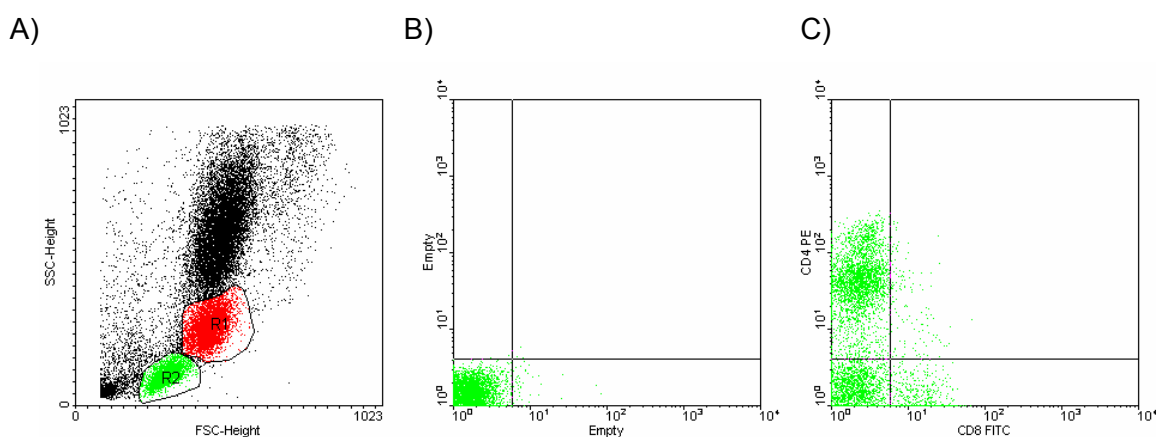


FIGURA 4 - Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ - Citometria de fluxo A) Separação das células por tamanho e granulação. Linfócitos em R2. B) Gate de linfócitos sem marcação (controle). C) Células CD4⁺ e CD8⁺.

3.4 – Histopatologia e densidade parasitária dos órgãos

3.4.1 – Punção de medula óssea

A punção de medula óssea foi realizada antes e 150 dias após o término do tratamento. Os animais foram tranqüilizados com acepromazina 1%, na dosagem de 0,1 mL/kg de peso por via intravenosa. Após 10 minutos, foi administrado anestésico geral, Tiopental Sódico 2,5%, na dose de 0,5 mL/kg de peso pela via intravenosa (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Depois de atingido o plano anestésico adequado foi realizada a tricotomia e anti-sepsia (Iodopovidine líquido a 1%) da região alvo. O aspirado medular foi obtido por punção medular da extremidade inferior do esterno ou da fossa intercondílica da tíbia. O conteúdo medular foi aspirado com agulha descartável, 12x40, acoplada à seringa descartável de 20 mL. Os esfregaços medulares, por sua vez, foram confeccionados em duplicata e corados por solução de Giemsa a 10%.

3.4.2 – Eutanásia dos animais

Após 150 dias do término do tratamento os animais foram eutanaziados conforme Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais. O procedimento inclui tranqüilização dos animais com Acepromazina 1%, na dosagem de 0,1 mL/kg de peso por via intravenosa e após 10 minutos, aplicação de anestésico geral, Thiopental Sódico 2,5%, na dose de 0,5 mL/kg de peso por via intravenosa. Depois de atingido o plano anestésico adequado foi administrado uma dose letal (0,3 mL/Kg) de T-61[®]. Após a comprovação da morte do animal foram iniciados os procedimentos para a necropsia e retirados os órgãos a serem analisados.

3.4.3 – Coleta de fragmentos dos órgãos

Os órgãos foram analisados macroscopicamente levando-se em consideração critérios como tamanho, peso e presença de lesões. Em seguida, foram retirados fragmentos de fígado, baço, linfonodo cervical, pele de orelha e costela. Foram realizados esfregaços por aposição e os fragmentos foram preservados em formol tamponado a 10% - pH 7,2 e criopreservados em Tissue Tek[®].

3.4.4 – Avaliação histopatológica dos órgãos

Lâminas contendo cortes parafinados de fígado, baço, linfonodo cervical, medula óssea e pele foram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina (descrita no item 3.4.5) e analisadas por microscopia óptica. As alterações histopatológicas avaliadas no baço foram o espessamento

e inflamação da cápsula, hipertrofia e hiperplasia da polpa branca e da polpa vermelha, congestão, deposição de hemossiderina e depleção de áreas T dependentes na polpa branca. No fígado observou-se a presença de granulomas, inflamação portal, fenômenos degenerativos, inflamação da cápsula, congestão sinusoidal, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer e deposição de hemossiderina. No linfonodo avaliou-se a linfadenite capsular, inflamação dos seios subcapsulares, hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides e dos macrófagos, congestão e presença de hemossiderina. Na medula óssea observou-se a hiperplasia das células e na pele avaliou-se a presença e intensidade da inflamação, fenômenos degenerativos, necrose, acantose, hiperqueratose, pérola córnea, paraceratose e úlceras.

Todas as alterações histopatológicas foram avaliadas de forma semi-quantitativa. Levou-se em consideração a extensão das alterações em todo o corte histológico, sendo assim classificadas: (1) Ausência de alteração; (2) Alteração discreta; (3) Alteração moderada; (4) Alteração intensa. Em relação ao quadro inflamatório observado na pele a análise seguiu os critérios descritos por Xavier et al. (2006), a saber:

Discreta: infiltrado inflamatório crônico, constituído por poucas células mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos), localizado de forma difusa na derme superficial e ao redor de vasos e anexos da derme profunda.

Moderada - infiltrado inflamatório crônico, constituído por várias células mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos), localizado preferencialmente ao redor de vasos e anexos da derme profunda.

Intensa - infiltrado inflamatório crônico, constituído por inúmeras células mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos), distribuído de forma difusa atingindo todas as camadas da derme, e por vezes, com presença de células gigantes, caracterizando uma inflamação do tipo gigante celular.

3.4.5 - Técnica da hematoxilina-eosina (HE)

As lâminas foram inicialmente desparafinadas em xilol, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes, e a seguir, lavadas com água corrente. Logo após, foram coradas em hematoxilina e, após nova lavagem, novamente coradas em eosina. As lâminas foram, então, banhadas em água corrente, desidratadas em soluções de álcool crescente e posteriormente diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo sintético.

3.4.6 – Avaliação da densidade de parasitos nos órgãos

O parasitismo nos órgãos foi avaliado pelo método de imuno-histoquímica, utilizando-se a técnica da estreptoavidina-peroxidase (descrita no item 3.4.7). A análise foi quantitativa levando-se em conta o número de amastigotas encontrado em vinte campos observados (440x) ao microscópio óptico.

No baço e na medula a avaliação da densidade de parasitos também foi realizada em esfregaços feitos por aposição utilizando-se o método de LDU (*Leishman donovani units*), que consiste em avaliar o número de formas amastigotas encontradas em 1000 núcleos de células mononucleares contados, divididos pelo peso do órgão. No caso de esfregaços de medula óssea o parasitismo foi avaliado levando-se em consideração somente o número de amastigotas encontradas em 1000 núcleos de células mononucleares contados (LDU modificado).

3.4.7 - Técnica da estreptoavidina- peroxidase para detecção de formas amastigotas

As lâminas, contendo cortes parafinados de tecidos, foram desparafinadas em xilol por 20 minutos, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes (álcool absoluto, 90°, 80° e 70° respectivamente) e submetidas a um banho em PBS (“Phosphate Buffer Saline”- pH 7,2, 0,01M) a 10%. Posteriormente fez-se o bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes diluída a 4% em PBS), por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram, então, cobertas com solução de bloqueio (Leite em pó desnatado diluído em PBS -12g de leite em 200 mL de PBS) e incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, o anticorpo primário (soro de cão infectado com *L. chagasi*, na diluição de 1/100 em BSA – soro albumina bovina) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 24 horas em câmara úmida a 4°C. A seguir, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1/100 - DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675, segundo Tafuri et al., 2004) e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se, então, o complexo estreptoavidina peroxidase seguido de incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16% em PBS, por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente fez-se a lavagem das lâminas em água corrente e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas em álcoois crescentes (70°, 80° 90° e álcool absoluto), diafanizadas em xilol, e montadas com bálsamo sintético.

Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. Como controle negativo, utilizou-se PBS, em substituição aos anticorpos primários. Como controle positivo foi utilizado uma lâmina com corte histológico de pele de orelha de um cão naturalmente infectado.

3.5 – Análise fenotípica das células mononucleares teciduais

3.5.1 – Técnica da imuno-histoquímica para fenotipagem das células teciduais

Os fragmentos dos órgãos fixados na solução criopreservadora Tissue Tek[®] foram cortados em criostato a 4,0 µm de espessura e fixados em lâminas previamente desengorduradas com solução álcool-éter. Posteriormente, os cortes de tecido foram hidratados em álcoois decrescentes (álcool absoluto, 90°, 80° e 70° respectivamente) e submetidas a um banho em PBS (“Phosphate Buffer Saline”- pH 7,2, 0,01M) a 10%. Posteriormente fez-se o bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes diluída a 4% em PBS), por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram, então, mergulhadas em solução de bloqueio (Leite em pó desnatado diluído em PBS -12g de leite em 200 mL de PBS) e incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, o anticorpo primário específico (descritos no quadro 2) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 24 horas em câmara úmida a 4°C. A seguir, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti camundongo e anti coelho, na diluição de 1/100 - DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675, segundo Tafuri et al., 2004) e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se, então, o complexo estreptoavidina peroxidase seguido de incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16% em PBS, por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente fez-se a lavagem das lâminas em água corrente e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas em álcoois crescentes (70°, 80°, 90° e álcool absoluto), diafanizadas em xilol, e montadas com bálsamo sintético. Como controle negativo, utilizou-se PBS, em substituição aos anticorpos primários.

QUADRO 2

Anticorpos utilizados na análise fenotípica das células teciduais

Anticorpo	Diluição	Marca
Mouse anti canine CD11a	1/100	MCA 80A488 – Serotec
Mouse anti canine CD11b	1/100	MCA 1777S – Serotec

3.5.2 - Análise das células marcadas

Após cada marcação, foram capturadas 20 imagens aleatórias do corte histológico de cada animal, utilizando-se uma micro-câmera JVC TK-1270/RGB e, em seguida, digitalizadas na objetiva de 40X para a criação de um banco de imagens. Para a avaliação fenotípica utilizou-se a média do número de células positivas observadas nas 20 imagens capturadas.

3.6 - Análises estatísticas

De acordo com a natureza dos dados, a comparação dos grupos em função do tempo foi realizada através dos testes Mann-Whitney. Para comparação entre os grupos utilizou-se Kruskal-Wallis. Todas as análises foram realizadas por meio dos programas estatísticos computacionais Prism 3,0, GraphPad InStat e Minitab 14, adotando um nível de significância de 95%.

4 – RESULTADOS

4.1 – Aspectos clínicos dos cães naturalmente infectados

4.1.1 – Aspectos clínicos observados antes do tratamento

A frequência dos principais sinais clínicos observados nos cães, antes do tratamento, encontra-se relacionada abaixo (GRAF1). Observou-se que linfadenopatia, alopecia, opacificação da pelagem, dermatite esfoliativa e dermatite ulcerativa foram os achados mais frequentes. Segundo Lima et al. (2004) o termo linfadenopatia é caracterizado pelos aspectos clínicos e macroscópicos dos linfonodos baseado no aumento de volume desses órgãos, que podem, então, serem avaliados na clínica pela palpação e na necropsia macroscopicamente. Nesse trabalho, a linfadenopatia dos linfonodos foi encontrada na maioria dos casos independente dos diferentes grupos avaliados. Todavia, isso ocorreu com maior frequência nos linfonodos cervicais, seguidos pelos poplíteos e submandibulares. Esses resultados serviram de parâmetro na escolha dos linfonodos cervicais para os estudos histológicos e imuno-histoquímicos.

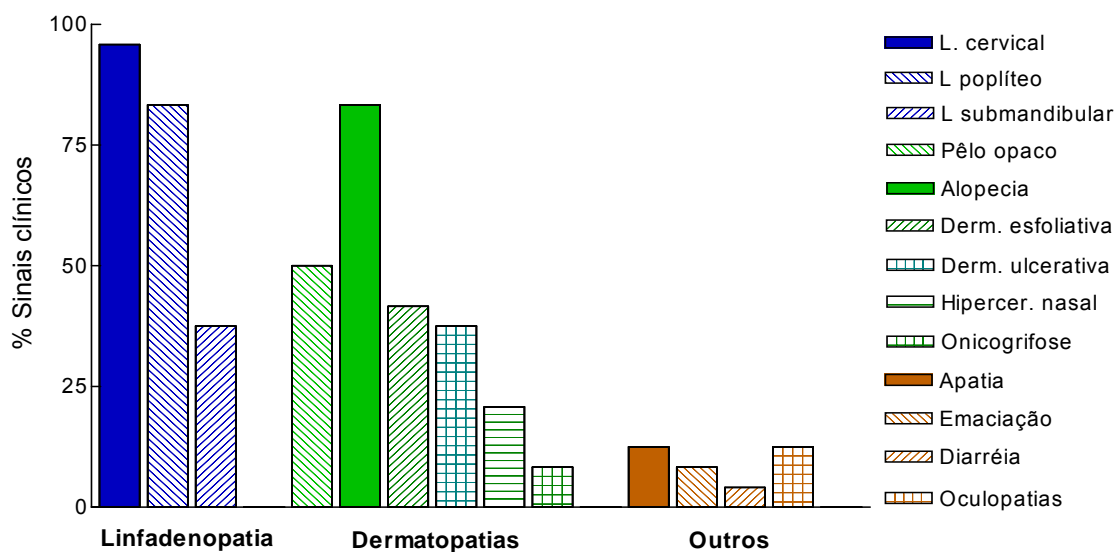


GRÁFICO 1 - Frequência dos sinais clínicos manifestados nos cães naturalmente infectados antes do tratamento.

4.1.2 – Aspectos clínicos observados depois do tratamento

No início do tratamento, os grupos apresentaram características homogêneas em relação ao peso, sexo e classificação clínica. Durante o experimento, nove cães foram submetidos à eutanásia para coleta de material, antes do prazo previsto (150 dias após tratamento), para que não viessem a óbito pela evolução da doença ou por lesões decorrentes de interferências físicas do próprio protocolo experimental dos animais locados nos canis do ICB. Estes nove cães distribuíram-se nos grupos da seguinte maneira: quatro cães no grupo Lp-Sb (33,3%) sendo que um cão (8,3%) foi eutanasiado por motivo de lesões decorrentes de interferências físicas e 3 cães (25%) por agravamento da doença. No grupo Lp somente um cão (8,3%) foi submetido a eutanásia por motivo de agravamento da doença. No grupo C, os quatro cães (33,3%) eutanasiados apresentavam agravamento da doença.

De modo geral, 30 dias após o tratamento, os cães do grupo Lp-Sb apresentaram uma melhora clínica variável, mas aos 60 dias houve um agravamento clínico da doença. Em geral, ao final do experimento, do ponto de vista clínico, os grupos encontravam-se semelhantes.

4.2 Resultados da análise fenotípica das células mononucleares caninas obtidas do sangue periférico

A expressão de CD11b nos monócitos caninos foi alterada pelo tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas, 60 dias após o tratamento.

A porcentagem de monócitos caninos provenientes do sangue periférico expressando CD11b foi mais alta no grupo Lp-Sb em relação ao grupo controle, 60 dias após o tratamento. Estes resultados sugerem que o tratamento pode modular a expressão de CD11b. Entretanto, esta diferença não foi observada na expressão de CD11a (TAB. 1).

TABELA 1

Expressão de CD11a,b na superfície de monócitos do sangue periférico de cães infectados com *L. chagasi*, tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, antes da interação com *L. chagasi in vitro*.

Tempo após tratamento	Grupos	(% monócitos)		(Intensidade fluorescência)	
		CD11a	CD11b	CD11a	CD11b
30 dias	Lp-Sb	86,2 ± 4,3 ^a	81,8 ± 9,2 ^a	17,2 ± 6,8	18,1 ± 7,4 ^a
	Lp	81,8 ± 5,5 ^a	77,1 ± 7,7 ^a	14,2 ± 6,4	16,4 ± 8,2
	C	82,2 ± 8,2 ^a	82,4 ± 5,8 ^a	17,0 ± 11,2	25,9 ± 22,0 ^a
60 dias	Lp-Sb	65,0 ± 17,0 ^a	67,7 ± 8,6 ^{ab}	20,0 ± 17,7	8,9 ± 3,4 ^a
	Lp	66,0 ± 14,9 ^a	64,8 ± 8,5 ^a	18,0 ± 6,5	11,6 ± 4,8
	C	64,0 ± 12,5 ^a	57,1 ± 5,9 ^{ab}	14,9 ± 6,6	11,0 ± 3,4 ^a

(a) Diferença de grupo entre tempos após tratamento (Teste T Student p<0,05) (b) Diferença entre grupos Lp-Sb e C (ANOVA p<0,05) (Lp-Sb) Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (Lp) Grupo tratado com lipossoma vazio e (C) Grupo controle

O tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas não alterou a expressão de CD11a e CD11b na superfície dos monócitos, após incubação “in vitro” com *L. chagasi*.

Não houve diferença significativa na porcentagem e na intensidade de fluorescência de monócitos expressando CD11a ou CD11b na sua superfície, entre os grupos analisados, após incubação in vitro com *L. chagasi*, tanto na ausência (SI) quanto na presença de soro de C5^{-/-}(SD) (TAB. 2). Resultados semelhantes também foram observados quando se levou em consideração a porcentagem de monócitos com dupla marcação (TAB. 3). Todavia, quando se considerou os valores de cada grupo nas condições SI e SD, observou-se que as expressões de CD11a,b foram mais baixas em SD, embora estas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, nos grupos Lp-Sb e Lp (TAB. 2). Esta diminuição se correlacionou com um aumento na porcentagem de células com dupla marcação (CD11a,b e *Leishmania*)(TAB. 3).

TABELA 2

Expressão de CD11a,b na superfície de monócitos do sangue periférico de cães infectados com *L. chagasi*, tratados com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, após interação *in vitro* com *L. chagasi* na presença ou não de soro C5^{-/-}

Tempo após tratamento	Grupo	(% monócitos)				(Intensidade fluorescência)			
		CD11a SI	CD11a SD	CD11b SI	CD11b SD	CD11a SI	CD11a SD	CD11b SI	CD11b SD
30 dias	Lp-Sb	40,9 ± 10,0	35,9 ± 21,0	43,9 ± 12,3	33,7 ± 16,8	14,0 ± 4,4	11,3 ± 5,0	21,9 ± 9,3 ^a	17,8 ± 5,6 ^a
	Lp	35,2 ± 13,0	36,4 ± 21,0	34,8 ± 12,7 ^a	36,9 ± 14,8	16,3 ± 6,9	12,1 ± 4,2	25,9 ± 15,5	15,7 ± 8,0 ^a
	C	37,3 ± 13,0 ^c	23,7 ± 11,9 ^c	39,1 ± 10,6 ^c	23,8 ± 10,4 ^{ac}	15,7 ± 4,6	9,80 ± 3,4 ^a	40,8 ± 31,2 ^a	17,5 ± 8,7 ^a
60 dias	Lp-Sb	44,7 ± 10,3	36,9 ± 10,9	47,1 ± 8,5	36,1 ± 12,0	14,8 ± 8,4	15,4 ± 7,1	14,4 ± 5,9 ^a	9,5 ± 2,0 ^a
	Lp	41,0 ± 14,0	38,9 ± 15,3	43,5 ± 8,4 ^a	35,4 ± 12,8	20,7 ± 8,5	16,6 ± 7,2	15,2 ± 6,6 ^c	8,8 ± 1,8 ^{ac}
	C	42,2 ± 2,80	31,1 ± 8,90	46,1 ± 4,9 ^c	35,5 ± 7,8 ^{ac}	17,2 ± 8,7	19,3 ± 10,3 ^a	13,4 ± 2,4 ^a	10,2 ± 1,6 ^a

(a) Diferença de grupo entre tempos após tratamento (Teste T student $p < 0,05$) (c) Diferença entre SI e SD (ANOVA $p < 0,05$) (Lp-Sb) Grupo tratado com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (LP) Grupo tratado com lipossoma vazio (C) Grupo controle (SI) Após incubação com promastigotas de *L. chagasi in vitro* (SD) Após incubação com promastigotas de *L. chagasi in vitro*, na presença de soro C5^{-/-}

TABELA 3

Expressão de CD11a,b na superfície de monócitos do sangue periférico de cães infectados com *L. chagasi*, tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, apresentando dupla marcação (CD11a,b/*Leishmania*), após interação *in vitro* com *L. chagasi*

Tempo após tratamento	Grupos	(% monócitos)			
		CD11a/L SI	CD11a/L SD	CD11b/L SI	CD11b/L SD
30 dias	Lp-Sb	45,7 ± 8,20 a	43,1 ± 15,4 a	45,6 ± 8,8 a	46,8 ± 12,9 a
	Lp	48,1 ± 12,1 a	43,6 ± 13,6	50,3 ± 10,3 ac	43,7 ± 12,0 c
	C	47,9 ± 16,6 a	42,5 ± 12,0	42,6 ± 12,2 a	43,5 ± 13,0
60 dias	Lp-Sb	28,5 ± 8,80 a	27,2 ± 12,8 a	27,0 ± 8,2 ac	34,9 ± 10,0 ac
	Lp	27,7 ± 10,9 ac	35,3 ± 12,8 c	28,9 ± 10,0 ac	36,2 ± 14,5 c
	C	25,9 ± 9,00 ac	33,2 ± 5,90 c	26,1 ± 9,9 a	32,1 ± 8,8

(a) Diferença de grupo entre tempos após tratamento (Teste T Student $p < 0,05$) (c) Diferença entre SI e SD (Teste T Student $p < 0,05$) (Lp-Sb) Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (Lp) Grupo tratado com lipossoma vazio e (C) Grupo controle

O receptor CD11b tem grande importância na interação *Leishmania*-monócitos caninos.

A intensidade de fluorescência emitida pela *Leishmania*, nos monócitos com dupla marcação, aumentou significativamente na presença do soro deficiente de fator C5^{-/-}, em todos os grupos, demonstrando a importância da opsonização do parasito na adesão da forma promastigota de *L. chagasi* aos monócitos caninos. Em paralelo ao aumento da adesão de *Leishmania*, constatou-se uma diminuição significativa da expressão de CD11b, sugerindo que a *Leishmania* deve estar ocupando o receptor CR3 (TAB. 4).

O tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas foi capaz de alterar a interação *Leishmania*-monócitos, 60 dias após o tratamento.

Diferente do observado no grupo controle, não houve diferença em relação ao número de *Leishmania* opsonizadas aderidas aos monócitos, 60 dias após o tratamento, no grupo Lp-Sb. Esta diferença, também não foi observada em relação à expressão de CD11b. Estes resultados sugerem que o tratamento inibiu a adesão de *Leishmania* opsonizadas aos monócitos caninos (TAB. 4)

TABELA 4

Intensidade de fluorescência em monócitos, expressando CD11a,b e *L. chagasi* (dupla marcação), do sangue periférico de cães infectados com *L. chagasi*, tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos

Tempo após trat	Grupo	Leish (MFI)		CD11a (MFI)		Leish (MFI)		CD11b (MFI)	
		CD11a/L SI	CD11a/L SD	CD11a/L SI	CD11a/L SD	CD11b/L SI	CD11b/L SD	CD11b/L SI	CD11b/L SD
30 dias	Lp-Sb	82,8 ± 10,0 ^{ac}	101,7 ± 20,0 ^{ac}	28,2 ± 15,7	23,7 ± 17,0	85,2 ± 8,2 ^{ac}	104,9 ± 21,2 ^{ac}	32,9 ± 12,9 ^{ac}	23,1 ± 8,1 ^c
	Lp	92,1 ± 18,5 ^a	103,4 ± 20,7 ^a	31,4 ± 18,0	23,4 ± 7,2 ^a	90,1 ± 13,2 ^a	98,7 ± 18,4 ^a	34,9 ± 18,7 ^c	19,6 ± 9,8 ^{ac}
	C	76,8 ± 21,9 ^{ac}	107,8 ± 23,0 ^{ac}	26,5 ± 9,5 ^{ac}	15,7 ± 6,9 ^{ac}	77,6 ± 17,6 ^{ac}	101,0 ± 22,5 ^{ac}	45,1 ± 30,0 ^{ac}	25,2 ± 14,6 ^{ac}
60 dias	Lp-Sb	48,5 ± 6,0 ^{ac}	63,8 ± 9,6 ^{ac}	26,9 ± 15,9	27,5 ± 15,2	51,3 ± 10,7 ^a	51,3 ± 11,5 ^a	18,2 ± 5,4 ^a	19,1 ± 13,5
	Lp	45,3 ± 8,6 ^{ac}	64,8 ± 14,1 ^{ac}	36,1 ± 16,3	35,0 ± 17,0 ^a	48,6 ± 8,0 ^{ac}	61,0 ± 13,5 ^{ac}	21,8 ± 10,4 ^c	12,6 ± 3,0 ^{ac}
	C	45,8 ± 8,4 ^{ac}	65,5 ± 13,7 ^{ac}	29,0 ± 15,3	30,2 ± 15,2 ^a	46,4 ± 5,4 ^{ac}	61,2 ± 6,7 ^{ac}	17,4 ± 3,0 ^{ac}	14,0 ± 3,8 ^{ac}

(a) Diferença de grupo entre tempos após tratamento (Teste T Student $p < 0,05$) (c) Diferença entre SI e SD (ANOVA $p < 0,05$) (Lp-Sb) Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (Lp) Grupo tratado com lipossoma vazio e (C) Grupo controle (MFI) Média da intensidade de fluorescência.

O receptor CD11c/CD18 parece não ser importante na interação *L. chagasi*-monócitos caninos.

Não foram detectados níveis expressivos de CD11c na superfície dos monócitos em nenhum dos grupos analisados. Este resultado sugere que este receptor parece não ser importante na adesão do parasito aos monócitos.

O tratamento com antimônio encapsulado em lipossomas não alterou a expressão de MHC classe II e de CD14 na superfície de monócitos caninos.

Não houve diferença significativa na expressão de moléculas de MHC classe II e de CD14 na superfície dos monócitos, entre os grupos analisados (TAB. 5).

O tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas alterou a porcentagem de linfócitos T CD8⁺, mas não interferiu na porcentagem de linfócitos T CD4⁺.

A porcentagem de linfócitos T CD4⁺ não foi afetada pelo tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas. Entretanto, observou-se que no grupo Lp o número de linfócitos T CD4⁺ foi significativamente menor do que o observado no grupo controle. A porcentagem de linfócitos T CD8⁺, não foi alterada significativamente no grupo Lp-Sb, nos dois momentos da análise, contrastando com o observado no grupo controle (TAB 5 e GRAF. 8). Estes resultados sugerem que o tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas foi capaz de modular a resposta imune mantendo os níveis de linfócitos T CD8⁺ no sangue circulante, por um período mais prolongado.

TABELA 5

Expressão de MHC classe II e CD14 em monócitos e freqüência das subclasses de linfócitos T presentes no sangue periférico de cães infectados com *L. chagasi*, tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos

Tempo após tratamento	Grupo	Monócitos				Linfócitos		
		MHC class II		CD14		CD4	CD8	CD4/CD8
		%	MFI	%	MFI	%	%	
30 dias	Lp-Sb	87,7 ± 8,0 a	13,0 ± 3,7	75,2 ± 9,2 a	159,4 ± 48,5 a	31,9 ± 11,4	33,3 ± 16,0	1,9 ± 2,3
	Lp	90,2 ± 3,3 a	10,0 ± 2,8 a	67,8 ± 13,1 a	116,9 ± 38,5 a	28,6 ± 10,7 d	36,7 ± 19,9	0,9 ± 0,6 a
	C	84,2 ± 9,1 a	11,0 ± 8,2 a	77,1 ± 13,8 a	185,8 ± 117,6	39,7 ± 7,5 d	32,0 ± 8,6 a	1,3 ± 0,4
60 dias	Lp-Sb	64,1 ± 12,9 a	16,4 ± 8,1	52,0 ± 14,2 a	84,2 ± 31,8 a	32,3 ± 9,8	30,4 ± 11,0	1,2 ± 0,6
	Lp	56,8 ± 14,7 a	17,9 ± 8,8 a	53,0 ± 9,6 a	69,4 ± 42,2 a	32,7 ± 6,0	29,7 ± 18,5	2,0 ± 1,9 a
	C	54,8 ± 19,2 a	20,4 ± 7,2 a	52,3 ± 16,6 a	93,2 ± 66,5	36,3 ± 5,1	20,6 ± 9,4 a	2,6 ± 2,6

(a) Diferença de grupo entre tempos após tratamento (Teste T Student p<0,05) (d) Diferença entre Lp e C (ANOVA p<0,05) (Lp-Sb) Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (Lp) Grupo tratado com lipossoma vazio e (C) Grupo controle

4.3 - Análise anátomo-patológica do baço

4.3.1 - Alterações macroscópicas

As alterações macroscópicas observadas com maior frequência foram o aumento de volume do órgão (esplenomegalia), o espessamento das bordas (bordas oblongas), o aspecto rugoso e irregular da superfície e a coloração vermelho-escura sugerindo um quadro de congestão. De fato, à superfície de corte, a polpa vermelha era friável e muitas vezes difluente indicando ainda mais o quadro de congestão. A polpa branca (folículos de Malpighi), na grande maioria dos casos, mostrou-se hiperplásica (hiperplasia folicular) facilmente visualizada macroscopicamente como pontos de coloração brancacenta, de tamanho variando de 0,2 a 0,5 cm de diâmetro, distribuídos difusamente na superfície do órgão.

Os dados obtidos em relação ao peso e tamanho do baço estão demonstrados na TAB. 6. Não houve diferença estatística em relação ao peso relativo do baço (peso do baço/peso corporal) entre os grupos analisados. Entretanto, no grupo C o tamanho do baço (cm²: comprimento x média da maior e menor altura) apresentou-se significativamente maior em relação aos outros grupos analisados.

TABELA 6

Relação peso do baço/peso corporal (peso relativo) e o tamanho do órgão de cães infectados com *L.chagasi*, submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos

Grupos	Peso relativo (%) (média ± DP)	Tamanho (cm ²) (média ± DP)
Lp-Sb	0,0053 ± 0,003	80,8 ± 30,1 [*]
Lp	0,0059 ± 0,001	75,8 ± 24,1 ^{**}
C	0,0070 ± 0,002	126,7 ± 49,8

Lp-Sb: Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossoma; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: grupo controle. ^{*} Diferença entre grupo Lp-Sb e C (ANOVA p<0,05), ^{**} Diferença entre grupo Lp e C (ANOVA p<0,05).

4.3.2 – Alterações microscópicas

As alterações histopatológicas observadas no baço dos cães analisados foram o espessamento e inflamação da cápsula, a hiperplasia e hipertrofia da polpa branca e da polpa vermelha, a congestão da polpa vermelha, a deposição de pigmentos de hemossiderina e a depleção da bainha periarteriolar na polpa branca.

Aproximadamente metade dos fragmentos de baço analisados apresentaram espessamento e inflamação da cápsula, com graus variados de intensidade. No grupo Lp o quadro inflamatório observado na cápsula foi significativamente mais intenso do que no grupo Lp-Sb ($p < 0,01$). Em relação à polpa branca observou-se que na maioria dos animais analisados os folículos de Malpighi estavam aumentados de volume e constituídos por células dispostas em diferentes camadas, de acordo com sua afinidade tintorial. As células mais centrais eram claras com núcleos vesiculosos e citoplasma acidófilo contendo ou não parasitos. Observou-se presença de pequenos linfócitos e células com núcleos fusiformes, com prolongamentos citoplasmáticos. Mais externamente, havia linfócitos dispostos em camada mais fina e finalmente células com as mesmas características centrais, porém mais claras (Figuras 5 a,b,c e d). O quadro de hiperplasia e hipertrofia da polpa branca foi mais intenso no grupo Lp-Sb em relação ao grupo Lp ($p < 0,05$).

A polpa vermelha sofreu modificações, em decorrência do aumento considerável do número de células, tanto de macrófagos marginais dos seios quanto dos cordões de Billroth e da pronunciada neoformação conjuntiva (fibroblastos jovens e fibrócitos), levando, no conjunto, à redução da luz dos seios. Todos os animais analisados apresentaram quadro de hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha, não havendo diferença estatística quanto à intensidade do mesmo entre os grupos analisados. Parasitos imuno-marcados foram facilmente visualizados nos macrófagos sinusoidais (FIG. 5 e,f). A congestão dos seios medulares e a presença de pigmentos de hemossiderina foi um achado freqüente, nos cães analisados, entretanto, observou-se que o grupo controle apresentou um quadro de congestão mais intenso em relação ao grupo Lp (GRÁF. 2). A depleção da bainha periarteriolar foi observada somente em um animal sintomático, pertencente ao grupo Lp (FIG. 5 g,h).

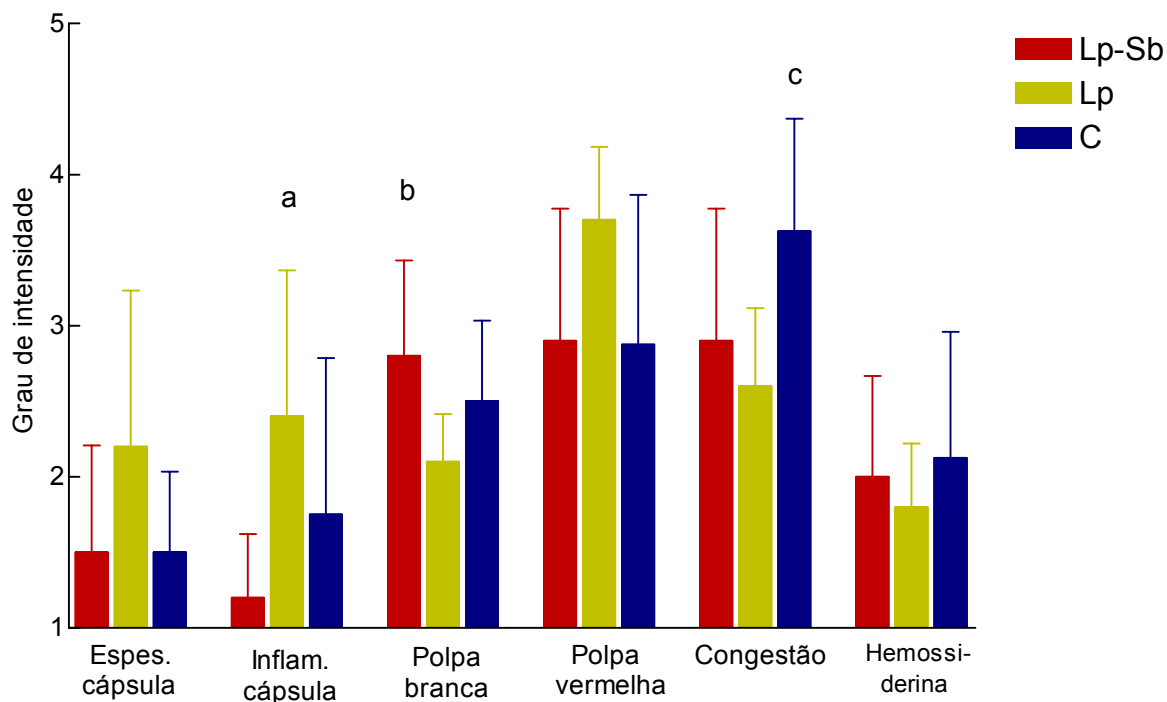


GRÁFICO 2 - Alterações histopatológicas observadas no baço de cães naturalmente infectados. Lp-Sb: grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas.; Lp: grupo tratado com lipossoma vazio; C: grupo controle. Critérios adotados: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa: (a) Diferença entre grupo Lp e Lp-Sb (Kruskall-Wallis $p < 0,05$) (b) Diferença entre grupo Lp-Sb e Lp (Kruskall-Wallis $p < 0,05$); (c) Diferença entre grupo C e Lp (Kruskall-Wallis $p < 0,05$).

4.3.3 – Caracterização por imuno-histoquímica do baço com marcação para os receptores CD11a,b/CD18

As reações específicas para CD11a e CD11b mostraram-se positivas preferencialmente ao redor da polpa branca e na polpa vermelha. Entretanto, células CD11a positivas também foram observadas no interior dos folículos linfóides da polpa branca (FIG. 6 a-f).

Não houve diferença significativa em relação ao número de células positivas para CD11a entre os grupos analisados. Entretanto, o grupo Lp apresentou maior número de células positivas para CD11b do que o grupo C. Estes resultados podem ser observados no (GRAF. 3).

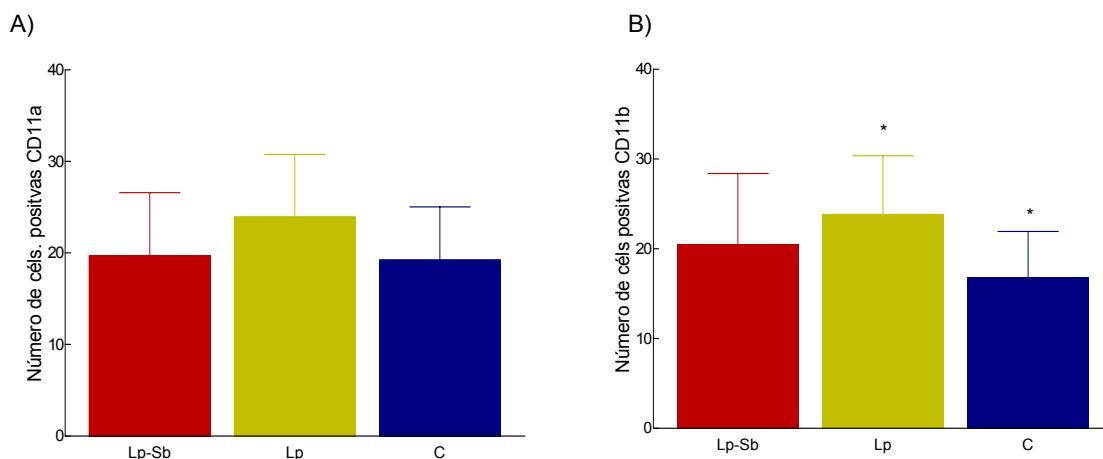


GRÁFICO 3 – Marcação fenotípica das células do baço em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimonio de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (a) Número de células positivas para CD11a (b) Número de células positivas para CD11b. Lp-Sb: Grupo tratado com antimonio de meglumina encapsulado em lipossoma nanométricos; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: Grupo controle. * Diferença entre grupo Lp e C (ANOVA $p < 0,05$).

4.3.4 – Avaliação da densidade parasitária

No baço a densidade parasitária foi avaliada pelas técnicas de LDU e imuno-histoquímica. O grupo Lp-Sb apresentou menor número de amastigotas do que os outros grupos analisados (GRAF. 4).

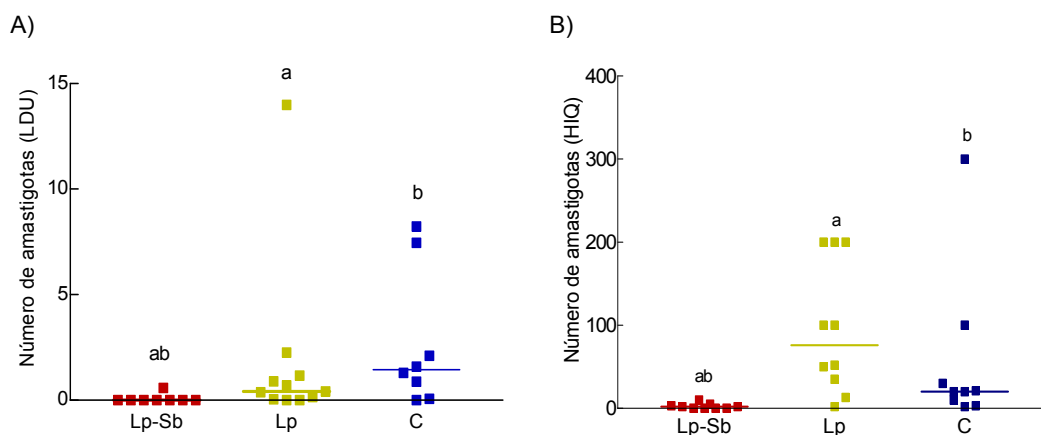


GRÁFICO 4 - Determinação do número de amastigotas no baço, pelas técnicas de LDU (A) e imuno-histoquímica (B) em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimonio de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos. Lp-Sb: Grupo tratado com antimonio de meglumina encapsulado em lipossoma; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: Grupo controle (a) Diferença entre grupo Lp-Sb e Lp (Kruskal-Wallis $p < 0,05$) (b) Diferença entre grupo Lp-Sb e C (Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

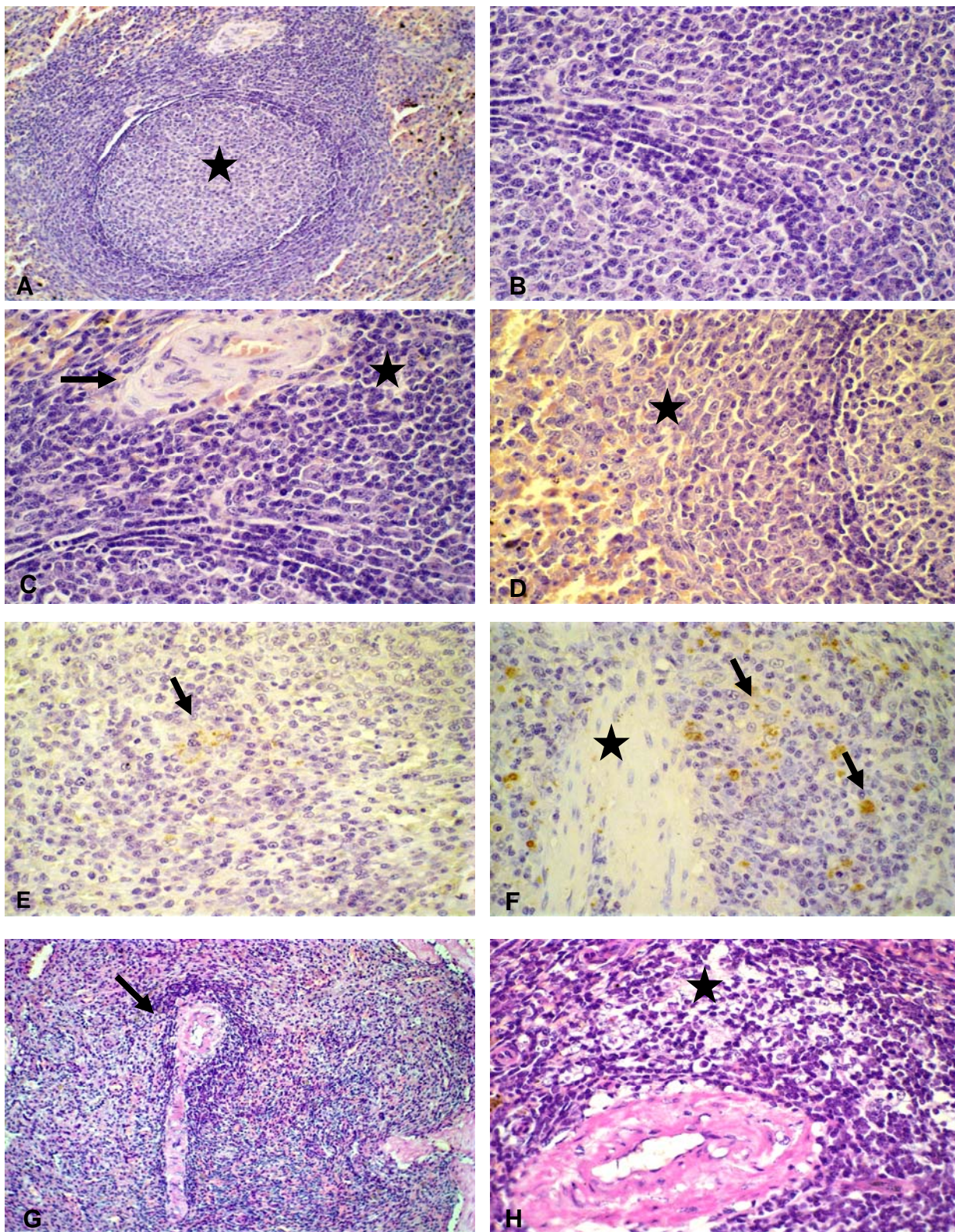


FIGURA 5- Fragmentos de baço de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*.: (A, B, C e D). (A) Fotomicrografia panorâmica evidenciando hiperplasia folicular (folículo de Malpighi) mostrando a formação de centro germinativo – área clara no centro do folículo (estrela) (HE 100x); (B,C). Detalhes da figura anterior e em (B) observar regiões celulares distintas com diferentes nuances de coloração conforme descrito no texto e em (C) notar a arteríola central (seta) com preservação da área T dependente. (estrela) (HE-600x); (D) Detalhe da região intermediária entre a polpa branca e polpa vermelha denominada zona marginal (estrela) (HE 600x); (E) Observar numerosas formas amastigotas de *Leishmania* imuno-marcadas na polpa vermelha (setas) (Estreptoavidina Peroxidase 600x); (F) Presença de macrófagos formando agregados de células intensamente parasitadas com *Leishmania* (setas) na polpa vermelha próximo a uma trabécula (estrela) (Estreptoavidina Peroxidase 600x); (G) Fotomicrografia panorâmica mostrando no centro a arteríola central (corte longitudinal) com depleção da área T dependente (seta) (HE - 200x) (H) Detalhe da figura anterior caracterizando a substituição linfocitária por macrófagos com citoplasma hipocorado (vacuolizados) (estrela) (HE 600x)

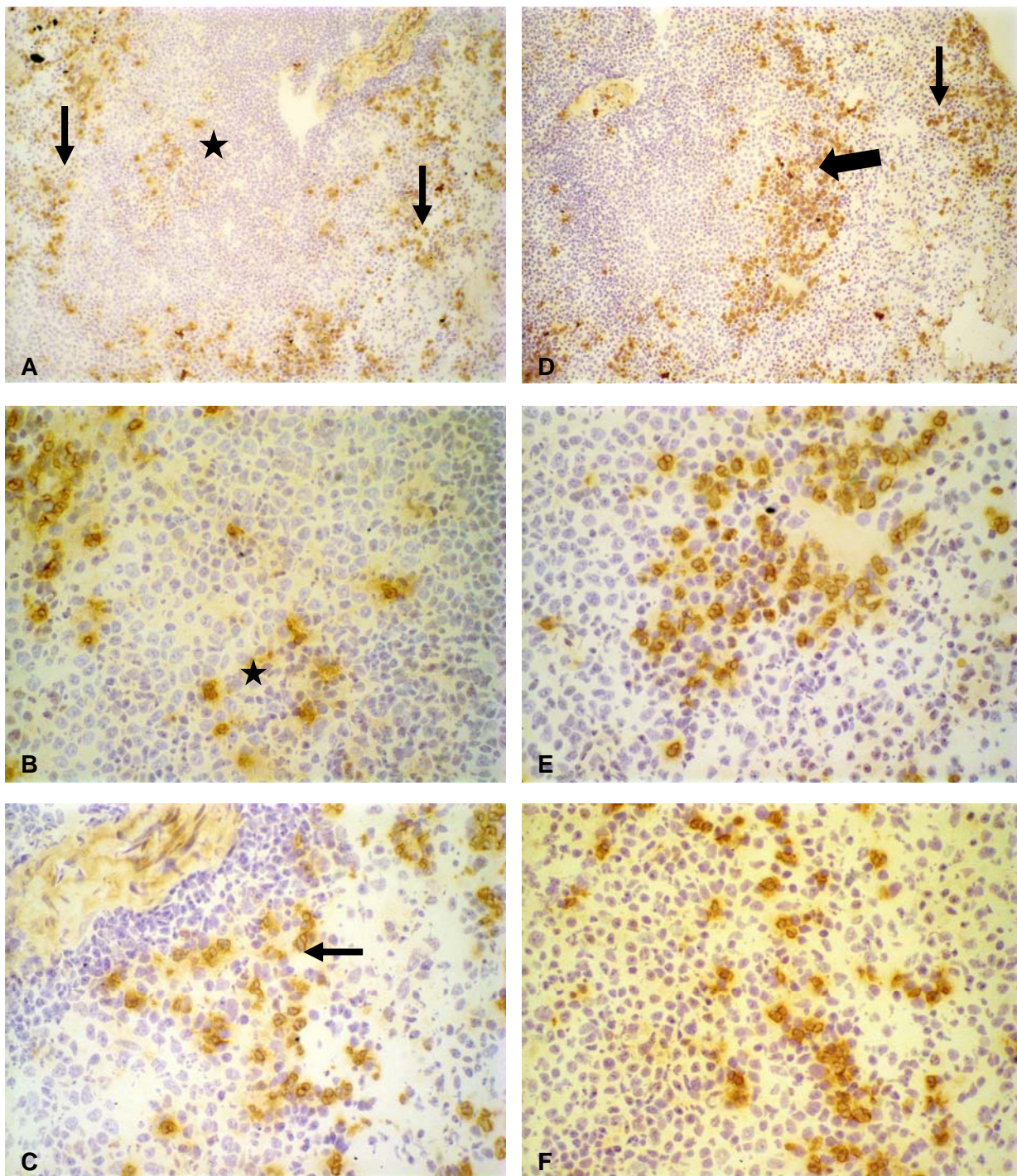


FIGURA 6 – Fragmentos de baço obtidos em criostato de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. Técnica imunohistoquímica da estreptoavidina peroxidase. (A) Microfotografia panorâmica evidenciando células CD11a positivas distribuídas na polpa branca (estrela) e polpa vermelha (setas) (100x) (B) Detalhe da figura anterior evidenciando células CD11a positivas no interior do folículo de Malpighi; e em (C) células CD11a positivas próximas à bainha periarteriolar na polpa vermelha (600x) (D) Microfotografia panorâmica evidenciando células CD11b positivas ao redor da polpa branca (zona marginal) (seta larga) e na polpa vermelha (seta fina) (100x) (E, F) Detalhe da figura anterior mostrando células CD11b positivas na zona marginal (600x).

4.4 - Análise anátomo-patológica do fígado

4.4.1 – Alterações macroscópicas

Em geral, as alterações macroscópicas observadas no fígado foram o aumento de peso e volume do órgão (hepatomegalia), a coloração vermelho-escuro, bordas espessadas (abauladas) sugerindo congestão. De fato, à superfície de corte, este órgão deixava fluir considerável quantidade de sangue que reforçava o quadro de congestão. Outra alteração também encontrada, mas em apenas alguns casos, foi a presença de nódulos de coloração brancacenta, tamanhos variando de 0,2 a 0,5 cm, distribuídos aleatoriamente na superfície do órgão, sem predileção por um lóbulo hepático ou outro. Todavia, estes não se aprofundavam à superfície de corte.

Os dados obtidos em relação ao peso e tamanho do fígado estão demonstrados na TAB. 7. Não houve diferença estatística em relação ao peso relativo (%) e ao tamanho (cm² comprimento x altura) do fígado entre os grupos analisados.

TABELA 7

Relação peso do fígado/peso corporal (peso relativo) e o tamanho do órgão de cães infectados com *L.chagasi*, submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos.

Grupos	Peso relativo (%) (média ± DP)	Tamanho (cm²) (média ± DP)
Lp-Sb	0,0029 ± 0,006	283,3 ± 98,4
Lp	0,0035 ± 0,010	281,9 ± 125,9
C	0,0028 ± 0,014	280,8 ± 136,1

Lp-Sb: Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossoma nanométricos; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: grupo controle.

4.4.2 – Alterações microscópicas

Em todos os animais observamos a presença de uma inflamação crônica caracterizada por um exsudato celular composto por macrófagos, plasmócitos e linfócitos e alguns polimorfonucleares neutrófilos e mais raramente eosinófilos de permeio. O exsudato era localizado nos espaço-porta hepáticos e no interior dos lóbulos, mas a lesão mais característica foi o rearranjo nodular desse exsudato principalmente intralobular, assim denominada, granuloma intralobular. Os granulomas hepáticos estavam presentes na grande maioria dos tecidos

examinados, exceto em um caso (97,22 % dos casos). Esses eram constituídos por um número de células entre seis a duas dezenas, formando nódulos isolados, raramente confluentes, preferencialmente localizados na luz dos sinusóides, ocluindo ou não, parcialmente, os mesmos. Constituíam-se, predominantemente, por macrófagos, algumas células epitelióides, pequeno número de linfócitos e raros granulócitos neutrófilos (Figura 7 a,b). Observou-se maior número de granulomas intralobulares no grupo controle em relação ao Lp-Sb (Gráfico 5).

A hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer foi uma alteração encontrada em todos os fragmentos de fígado examinados. Outras alterações observadas, mas de menor frequência, foram a inflamação crônica da cápsula de Glisson, a presença de fenômenos degenerativos (degeneração hidrópica e/ou esteatose), a congestão sinusoidal, e a deposição de pigmentos de hemossiderina (Figuras 7 c,d,e e f). Dentre essas alterações, o quadro inflamatório observado nos espaço-porta foi mais intenso nas preparações do grupo controle em relação ao Lp-Sb (Gráfico 12).

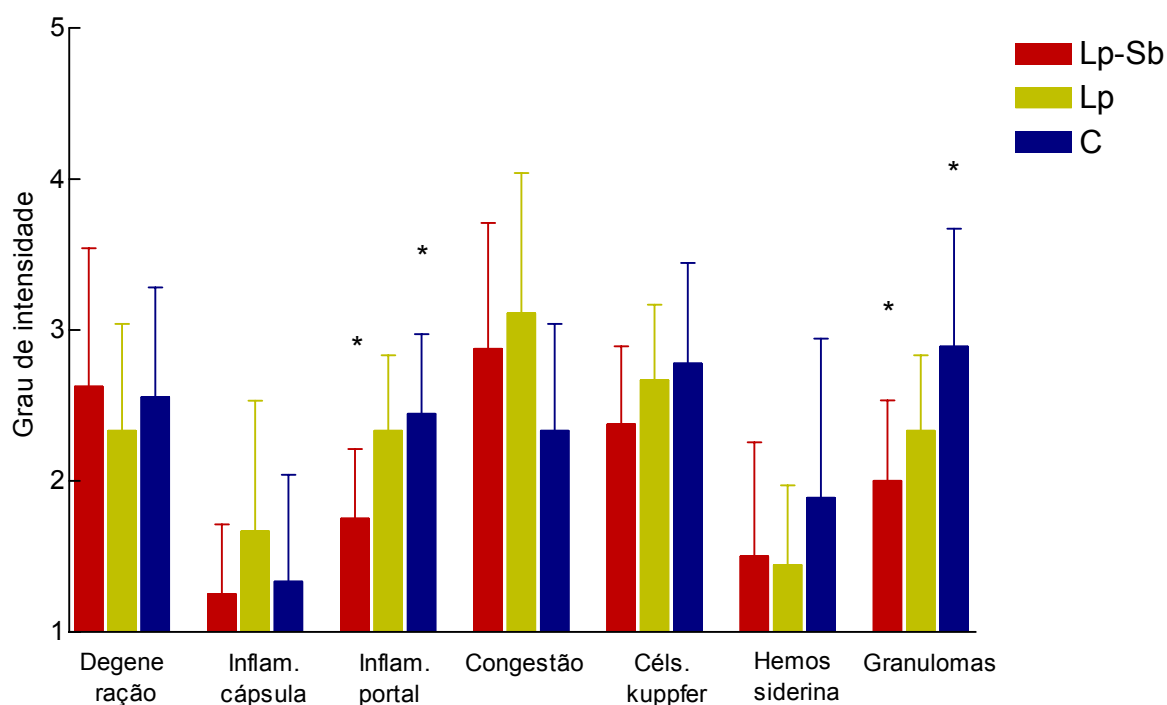


GRÁFICO 5 - Alterações histopatológicas observadas no fígado de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Lp-Sb: grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos. Lp: grupo tratado com lipossoma vazio; C: grupo controle. Critérios adotados: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa. * Diferença significativa entre grupos Lp-Sb e C (Kruskall-Wallis $p < 0,05$).

4.4.3 – Caracterização por imuno-histoquímica das células do fígado com marcação para os receptores CD11a,b/CD18

A reação imuno-histoquímica mostrou-se positiva preferencialmente nos macrófagos sinusoidais e inflamatórios nos granulomas e espaço-porta hepáticos. As marcações imuno-histoquímicas puderam ser bem notadas ao redor das células, sendo as mesmas nas membranas citoplasmáticas e não intracelulares (FIG.8 a-d)

Não houve diferença significativa quanto ao número de células positivas tanto para a expressão de CD11a quanto para CD11b entre os grupos analisados (GRAF. 6).

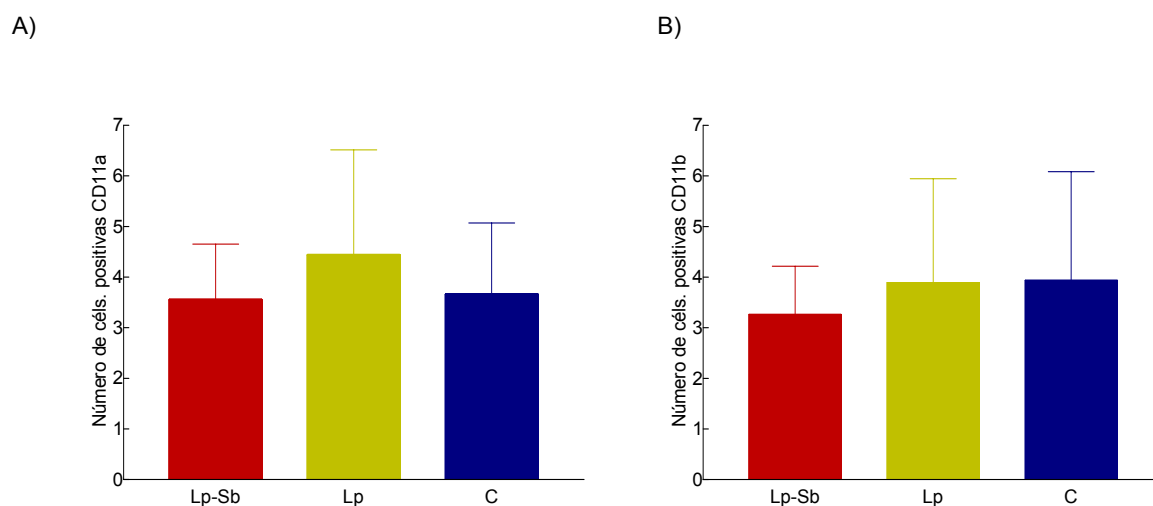


GRÁFICO 6 – Marcação fenotípica das células do fígado em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (A) Número de células positivas para CD11a (B) Número de células positivas para CD11b. Lp-Sb: Grupo tratado com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossoma nanométricos; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: Grupo controle.

4.4.4 – Avaliação da densidade de parasitos

O número de amastigotas observadas no fígado, avaliada pela técnica da imuno-histoquímica (FIG 8 e,f), foi significativamente menor no grupo Lp-Sb (GRAF.7)

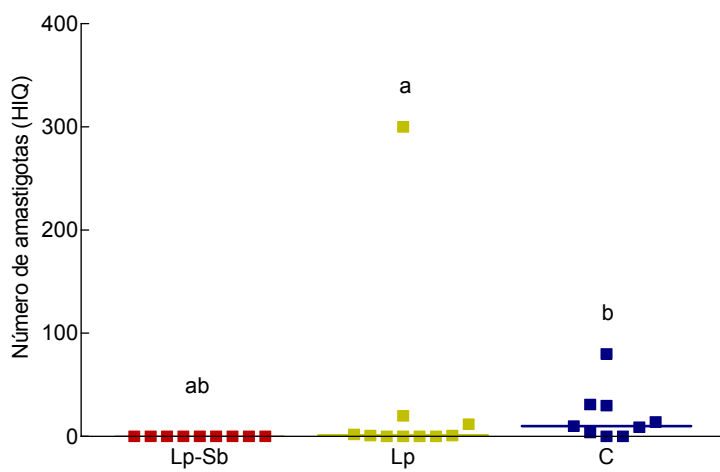


GRÁFICO 7 – Determinação do número de amastigotas no fígado, pela técnica de imuno-histoquímica, em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimonialto de meglumina encapsulado em lipossomas. Lp-Sb: Grupo tratado com antimonialto de meglumina encapsulado em lipossoma nanométricos; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: grupo controle. (a) Diferença entre grupo Lp-Sb e Lp (b) Diferença entre grupo Lp-Sb e C (Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

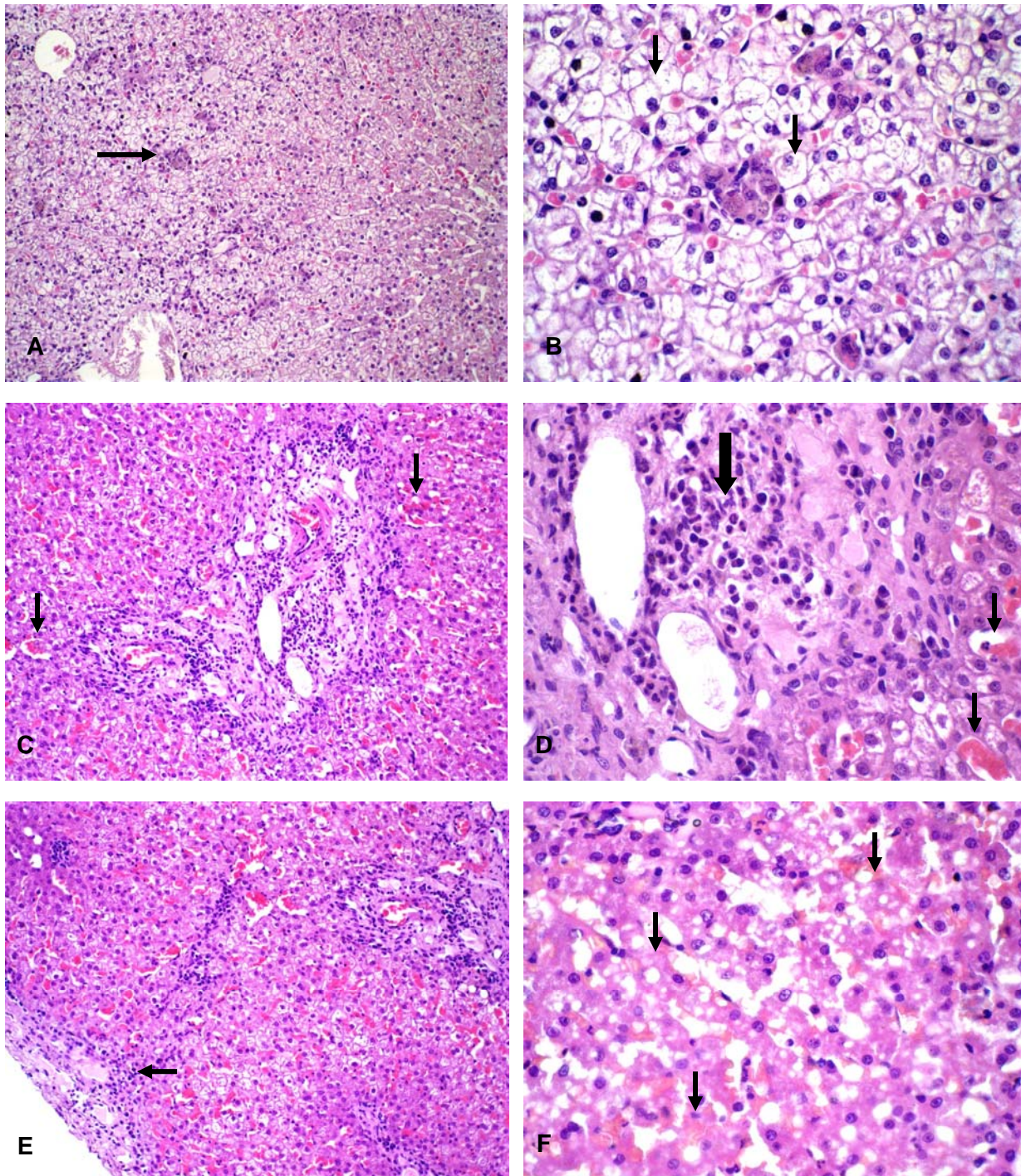


FIGURA 7 - Fragmentos de fígado de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. (A) Fotomicrografia panorâmica do lóbulo hepático (veia centro lobular no canto superior esquerdo e parte do ramo da veia porta (espaço-porta) no canto inferior esquerdo. Notar formação de granuloma intralobular (seta) (HE 100x). (B) Detalhes da figura anterior evidenciando o granuloma no centro da figura. Observar ao redor intenso processo degenerativo (degeneração hidrópica) dos hepatócitos, aumentados de volume (aspecto baloniforme) e citoplasma hipocorado. (setas) (HE 600x) (C) No centro da figura observar infiltrado inflamatório no espaço porta e congestão dos sinusóides (setas) (HE-200x); (D) Detalhe da figura anterior evidenciando infiltrado inflamatório de células mononucleares no espaço porta (setas largas) e a congestão dos sinusóides (setas finas) (HE 600x) (E) Fotomicrografia panorâmica evidenciando processo inflamatório focal na cápsula de Glisson (seta) (HE 100x). (F) Detalhe da figura anterior evidenciando hepatócitos com citoplasma vacuolizado (imagem negativa) indicando processo degenerativo por acúmulo de gordura (esteatose) (HE 600x)

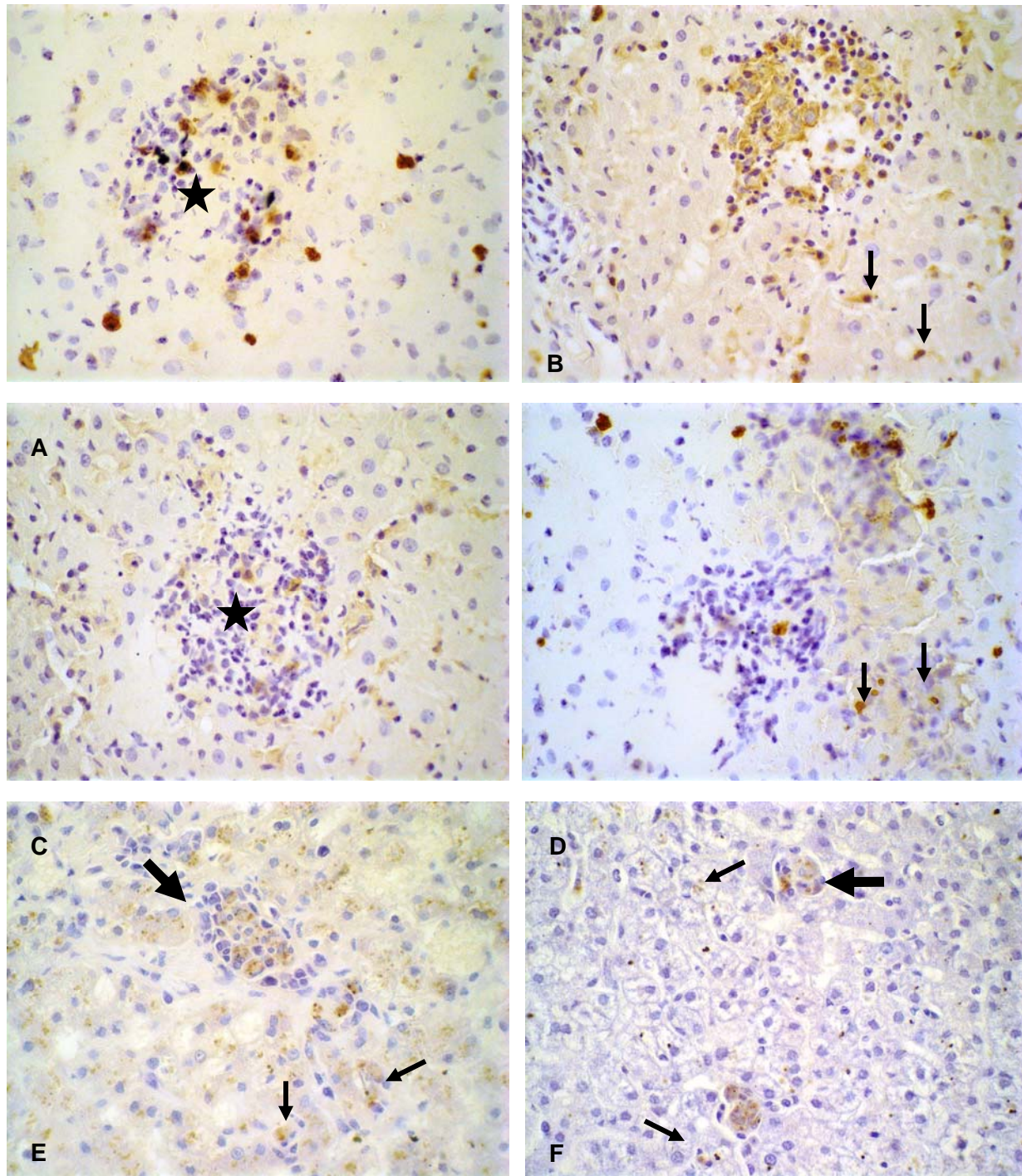


FIGURA 8 – Fragmentos de fígado obtidos em criostato de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. (Técnica imunohistoquímica da estreptoavidina peroxidase. 600x) (A) Granulomas intralobulares com células CD11a positivas (estrela). (B) Notar que algumas células sinusoidais são CD11a positivas (setas). (C) Granulomas com algumas células CD11b positivas (estrela) (D) Notar que algumas células sinusoidais são CD11b positivas (setas). (E,F) Notar a presença de inúmeras amastigotas de *Leishmania* imuno-marcadas no interior dos granulomas (seta larga) e nas células dos sinusóides (setas finas).

4.5 - Análise anátomo-patológica do linfonodo cervical

4.5.1 - Alterações macroscópicas

De todos os linfonodos (submandibulares, cervicais superficiais, axilares, abdominais e poplíteos) observados à necropsia, os cervicais foram os mais reativos. De fato, os mesmos apresentaram aumento de peso e volume (linfadenopatia) e à superfície de corte apresentaram-se com superfície lisa e brilhante exibindo um líquido de aspecto leitoso indicando edema do tipo exsudato. Ainda à superfície de corte, a camada cortical do órgão era notável e de fácil discernimento da camada medular, devido à presença de formações nodulares, de coloração brancacenta, indicando hiperplasia folicular. Esses nódulos, por sua vez, podiam ser confluentes originando áreas de superfície mais extensas.

Não houve diferença estatística em relação ao peso relativo do órgão entre os grupos avaliados (TAB. 8).

TABELA 8

Relação peso do linfonodo cervical/peso corporal (peso relativo) de cães infectados com *L.chagasi*, submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de dimensões nanométricas

Grupos	Peso relativo (%) (média ± DP)
Lp-Sb	0,0004 ± 0,0001
Lp	0,0006 ± 0,003
C	0,0003 ± 0,002

Lp-Sb: Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossoma; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: grupo controle.

4.5.2 – Alterações microscópicas

As alterações microscópicas avaliadas nas preparações dos linfonodos cervicais foram a linfadenite capsular, a inflamação dos seios subcapsulares, a hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides, a hiperplasia e hipertrofia de macrófagos (incluindo os sub-capsulares), congestão e presença de pigmentos de hemossiderina.

A linfadenite capsular e o aumento da celularidade dos seios subcapsulares foram achados freqüentes nos cães analisados, com graus variados de intensidade, não havendo, entretanto, diferença significativa entre os grupos estudados.

Em relação aos nódulos linfóides observou-se reação folicular com formação de centro germinativo e folículos apresentando coalescência (em correspondência ao observado à macroscopia) nas quais as células apresentavam-se claras, com núcleo vesiculosos e citoplasma amplo, às vezes parasitadas, alternando-se com outras células pequenas, com núcleo denso e citoplasma escasso. Em geral, a área marginal dos folículos era constituída de células pequenas com cromatina densa características de linfócitos. Observou-se também reação intensa da cortical profunda (paracortical) levando a formação de verdadeiros mantos constituídos de células mononucleares com núcleos densos e células fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos, sugerindo serem células dendríticas. Um outro achado freqüente foi a hiperplasia e hipertrofia de macrófagos dos seios e cordões associado a presença de áreas eosinofílicas, acelulares e amorfas indicando líquido de edema do tipo exsudato (FIG. 9 a-e).

Não houve diferença significativa entre os grupos analisados em relação à hiperplasia e hipertrofia dos cordões medulares e dos nódulos linfóides (GRAF 8).

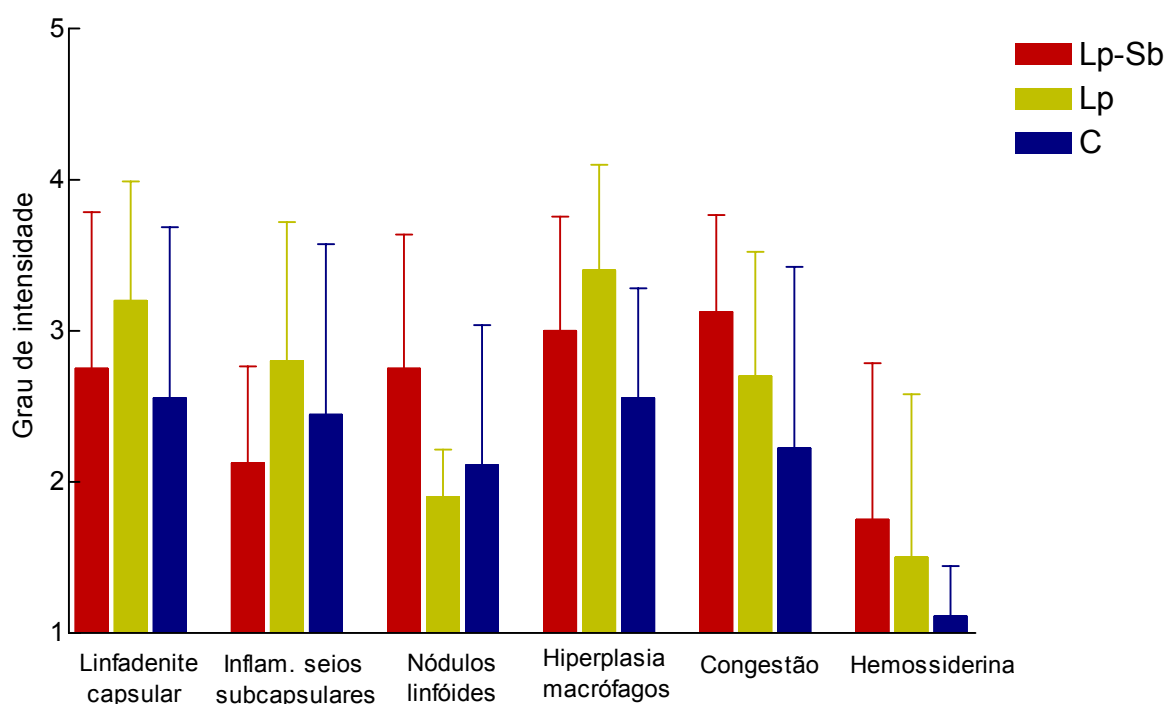


GRÁFICO 8 - Alterações histopatológicas observadas no linfonodo cervical de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Lp-Sb: grupo tratado com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos. Lp: grupo tratado com lipossoma vazio; C: grupo controle. Critérios adotados: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa.

4.5.3 – Caracterização por imuno-histoquímica das células do linfonodo cervical com marcação para os receptores CD11a,b/CD18

As reações imunocitoquímicas específicas para CD11a e CD11b mostraram-se positivas principalmente nas células dos cordões e seios medulares. Não houve diferença significativa em relação ao número de células positivas tanto para CD11a quanto para CD11b entre os grupos analisados (GRAF. 9).

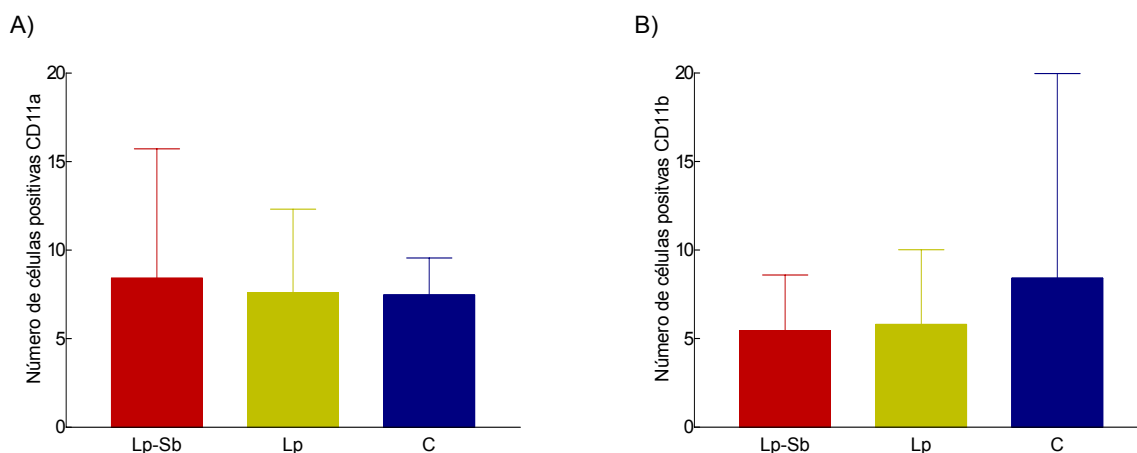


GRÁFICO 9 – Marcação fenotípica das células do linfonodo cervical em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos (a) Número de células positivas para CD11a (b) Número de células positivas para CD11b. Lp-Sb: Grupo tratado com antimoníaco de meglumina encapsulado em lipossoma; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: Grupo controle.

4.5.4 – Avaliação da densidade de parasitos

A densidade de parasitos foi determinada pela técnica de imuno-histoquímica (FIG. 9 f) e observou-se que o grupo Lp-Sb apresentou menor número de amastigotas em relação aos outros grupos analisados (GRAF. 10). A intensidade parasitária correlacionou-se com a linfadenite capsular e com a hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides.

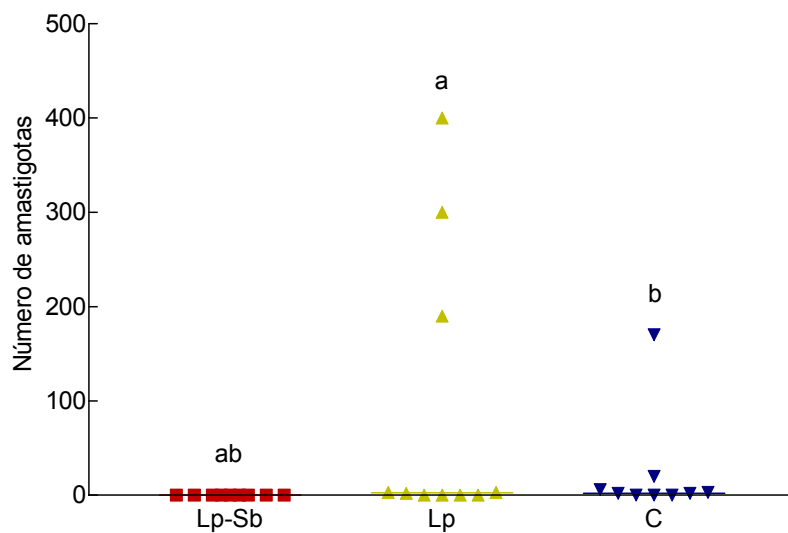


GRÁFICO 10 - Avaliação da densidade de parasitos no linfonodo cervical pela técnica de imuno-histoquímica em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas. Lp-Sb: Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossoma nanométricos; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: Grupo controle. (a) Diferença entre grupo Lp-Sb e Lp (Kruskall-Wallis $p < 0,05$) (b) Diferença entre grupo Lp-Sb e C (Kruskall-Wallis $p < 0,05$).

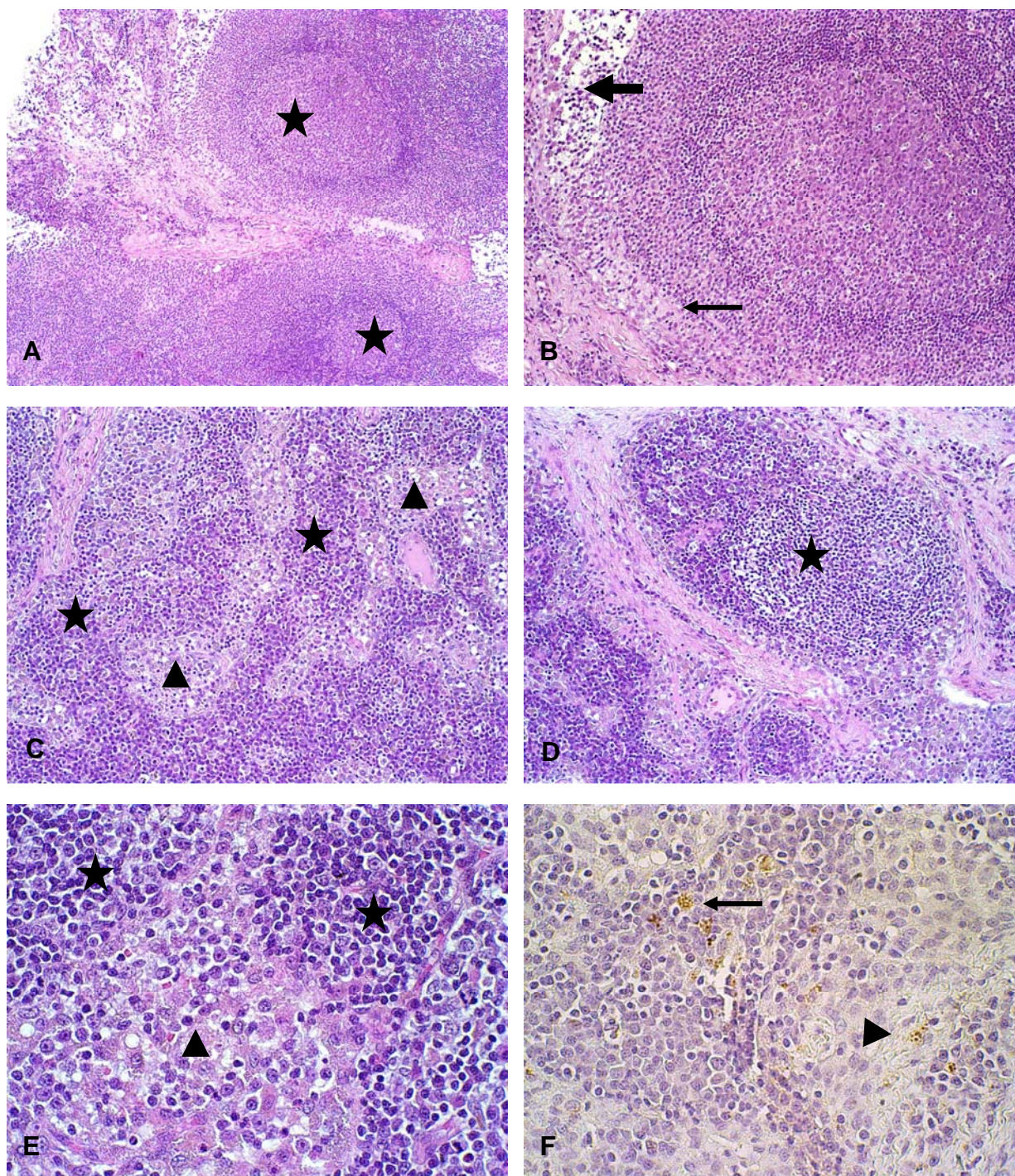


FIGURA 9 - Fragmentos de linfonodo cervical de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. (A) Fotomicrografia panorâmica da região da cortical demonstrando a hiperplasia folicular com formação de centros germinativos (estrelas). (HE 100x). (B) Detalhes da figura anterior evidenciando o centro germinativo de um folículo linfóide. Notar o aumento da celularidade do espaço subcapsular (seta larga) e edema (seta fina) (HE 200x) (C,D) Fotomicrografia panorâmica da região da medular evidenciando a hipertrofia e hiperplasia das células dos cordões (estrela) e seios (cabeça de setas) e em (D) notar a reatividade celular no cordão formando um verdadeiro nódulo linfóide na região da cortical (estrela) (HE-100x); (E) Detalhe da figura anterior mostrando células dos cordões (estrelas) e seios (cabeça de seta) (HE 600x) (F) Região da medular mostrando formas amastigotas de *Leishmania* no interior dos macrófagos dos cordões (seta) e seios (cabeça de seta) (Estreptoavidina-peroxidase 600x)

4.6 - Análises histológicas da medula óssea

4.6.1 – Alterações microscópicas

Em geral, todos os animais avaliados neste estudo apresentaram aumento considerável da celularidade devido, principalmente, ao incremento das séries linfocítica e monocítica. Paralelamente, observaram-se hipocelularidade granulocítica, com escassez de granulócitos neutrófilos e eosinófilos (FIG. 10 a-c). Este quadro não diferiu entre os grupos analisados.

4.6.2 – Avaliação da densidade de parasitos

A densidade de amastigotas na medula óssea foi avaliada pelas técnicas de LDU e imuno-histoquímica. O grupo Lp-Sb apresentou menor número de parasitos em relação aos outros grupos analisados na técnica de LDU. A análise realizada pela técnica de imuno-histoquímica (FIG. 10 d) não mostrou diferenças entre os grupos (GRAF. 11).

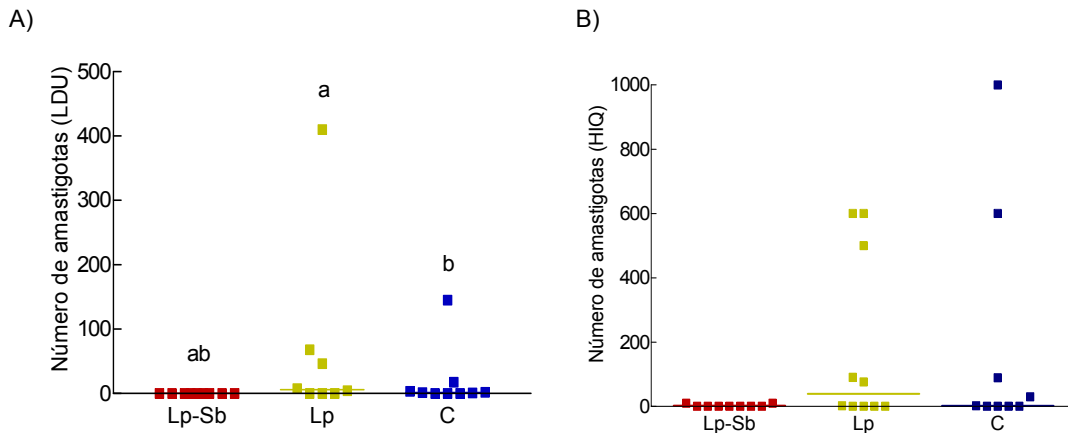


GRÁFICO 11 - Determinação do número de amastigotas na medula óssea, pelas técnicas de LDU (A) e imuno-histoquímica (B) em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimoniató de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos. Lp-Sb: Grupo tratado com antimoniató de meglumina encapsulado em lipossoma; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: Grupo controle. (a) Diferença entre grupo Lp-Sb e Lp (Kruskal-Wallis $p < 0,05$) (b) Diferença entre grupo Lp-Sb e C (Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

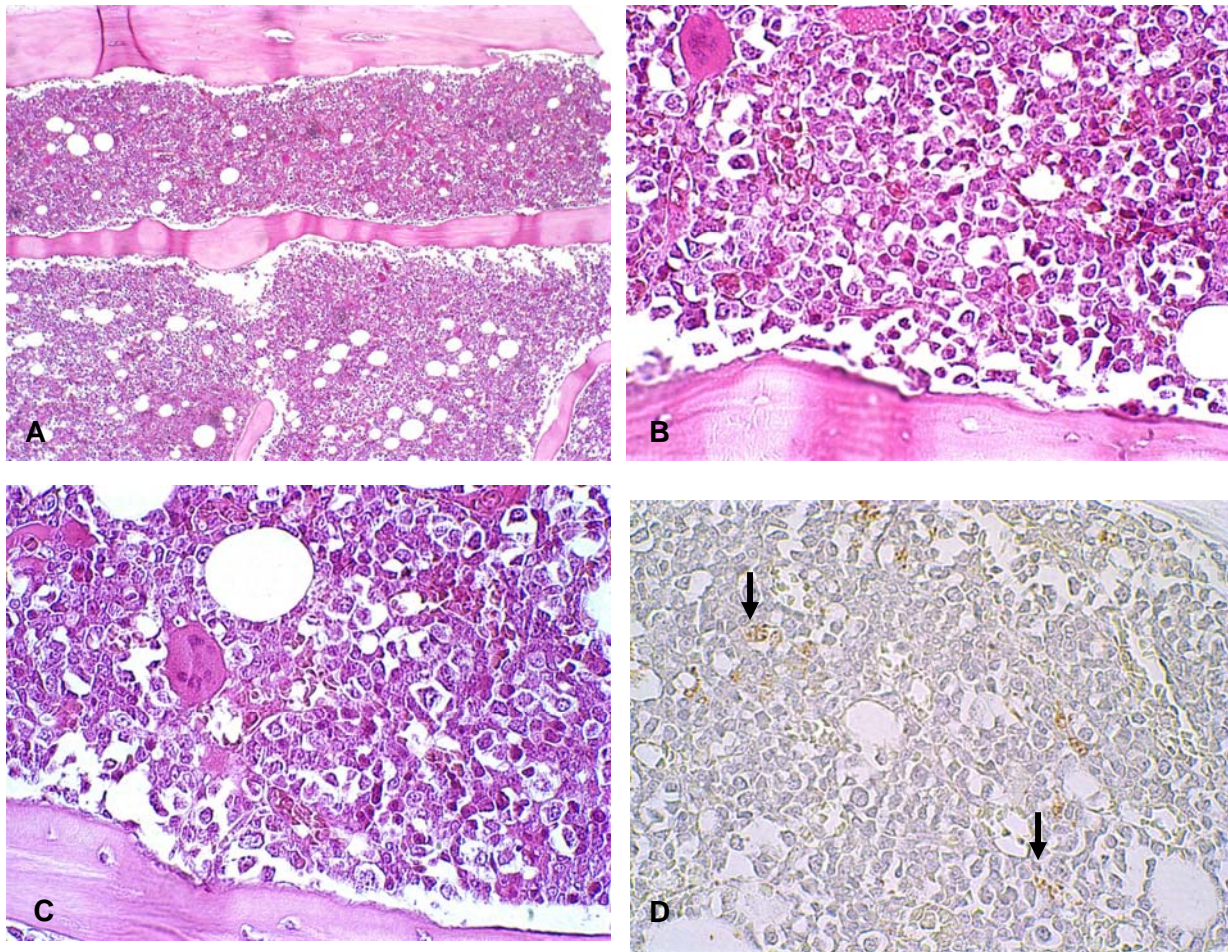


FIGURA 10 : Fragmentos de medula óssea de cão naturalmente infectado com *L. chagasi*. (A) Fotomicrografia panorâmica mostrando considerável celularidade. (HE 100x) (B, C) Detalhe da figura anterior evidenciando hiper celularidade de células mononucleares e hipocelularidade granulocítica (neutrófilos e eosinófilos). (HE 600x) (D) Presença de parasitos imunomarcados (setas) (estreptoavidina-peroxidase 600x)

4.7 - Análise histopatológica da pele

4.7.1 – Alterações macroscópicas

As alterações macroscópicas, observadas na pele dos cães foram: dermatite esfoliativa generalizada, dermatite ulcerativa, alopecia, opacificação da pelagem e hiperkeratose nasal.

4.7.2 – Alterações microscópicas

Todos os animais analisados apresentaram uma reação inflamatória variando de discreta a intensa, sendo o exsudato celular constituído principalmente de células mononucleares (linfoplasmohistiocitário), com presença de alguns granulócitos neutrófilos e raros eosinófilos. Em geral, a distribuição do exsudato inflamatório era difusa na derme e focal ao redor dos vasos e anexos. Não se observou a formação de granulomas e nem a presença de células gigantes na pele em nenhum dos cães analisados. Hiperkeratose foi um achado freqüente, mas somente em alguns cães observou-se formação de pérolas córneas. Vários cães apresentaram parakeratose e acantose (FIG 11 a,b). Presença de degenerações epiteliais como a degeneração hidrópica foi observada na maioria dos casos.

Não se observou diferença estatística entre os grupos analisados em relação às alterações histopatológicas avaliadas (GRAF. 12).

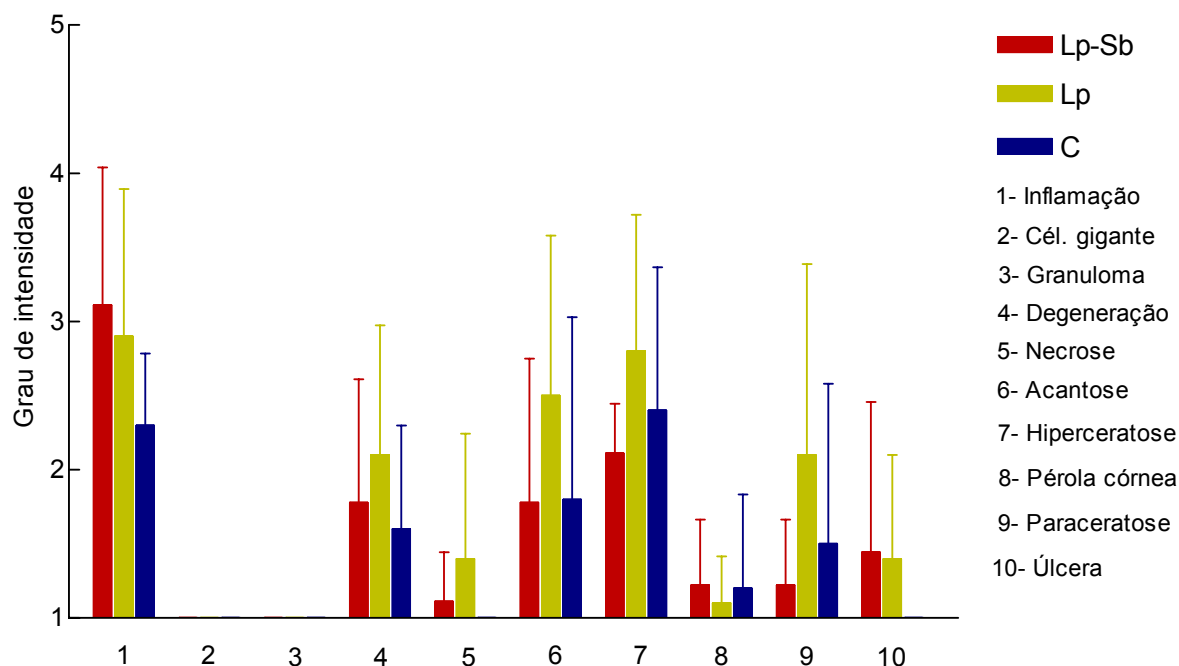


GRÁFICO 12 - Alterações histopatológicas observadas na pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Lp-Sb; grupo tratado com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos. Lp; grupo tratado com lipossoma vazio; C: grupo controle. Critérios adotados: 1- Ausência de alteração; 2- Alteração discreta; 3- Alteração moderada; 4- Alteração intensa.

4.7.3 – Caracterização por imuno-histoquímica das células da pele com marcação para os receptores CD11a,b/CD18

As reações de imuno-histoquímica para identificação de CD11a e CD11b mostraram-se positivas apenas para algumas células do exsudato inflamatório (FIG. 11 e,f).

Não houve diferença significativa em relação ao número de células CD11a,b positivas, entre os grupos analisados (GRAF. 13).

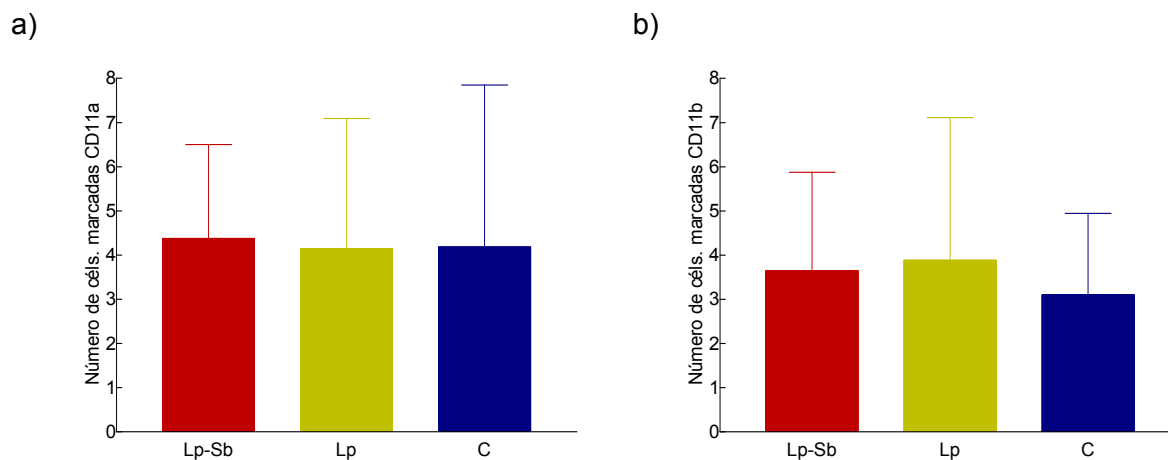


GRÁFICO 13: Análise fenotípica das células da pele em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas (a) Número de células positivas para CD11a (b) Número de células positivas para CD11b. Lp-Sb: Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossoma nanométricos; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: Grupo controle.

4.7.4 – Avaliação da densidade de parasitos

A densidade de parasitos na pele (FIG. 11 c,d) não mostrou diferença entre os grupos, quando avaliada pela técnica de imuno-histoquímica. (GRAF. 14).

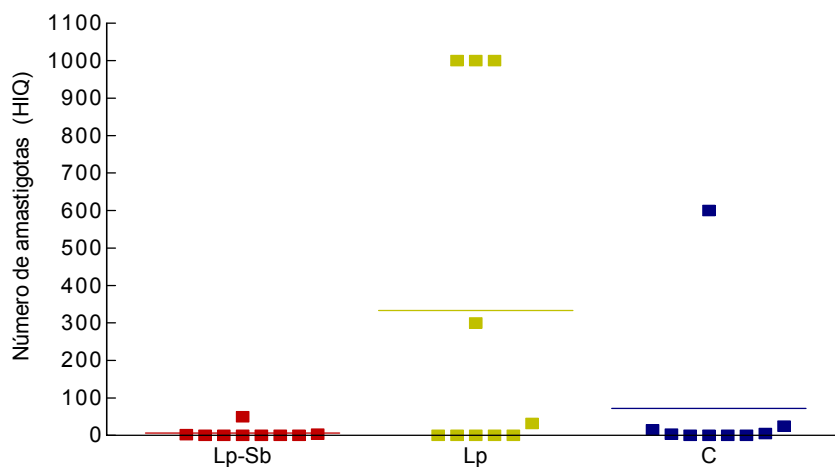


GRÁFICO 14 - Determinação do número de amastigotas na pele de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas, pela técnica de imuno-histoquímica. Lp-Sb: Grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossoma nanométricos; Lp: Grupo tratado com lipossoma vazio; C: Grupo controle.

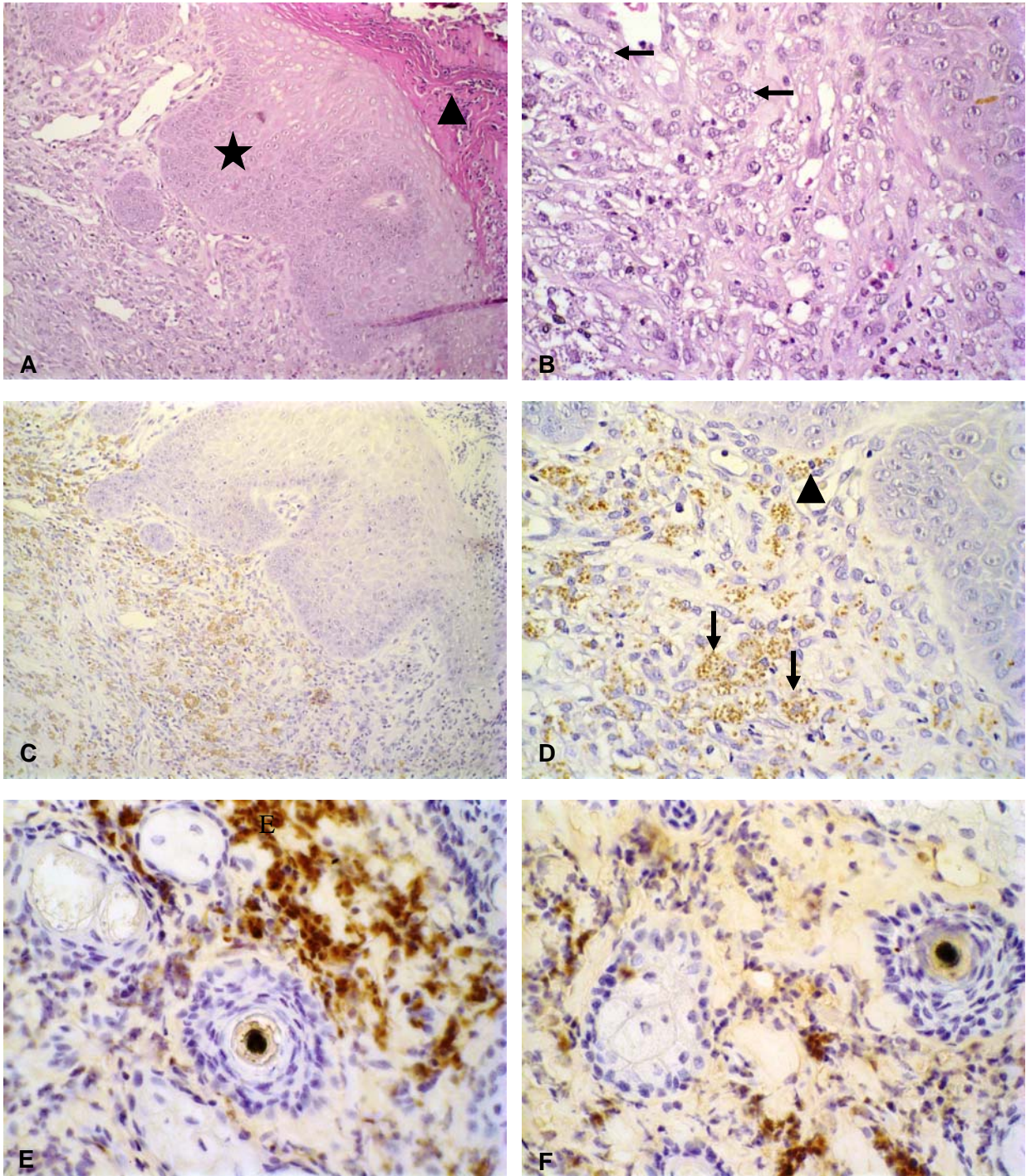


Figura 11: Fragmentos de pele de cão naturalmente infectado com *L. chagasi*. (A) Fotomicrografia panorâmica mostrando presença de células inflamatórias na derme superficial. Notar o espessamento da epiderme devido a acantose (estrela). Hiperkeratose é evidente (cabeça de seta) (HE 100x) (B) Detalhe da figura anterior evidenciando macrófagos contendo numerosas formas amastigotas (setas). (C,D) Técnica de imuno-histoquímica evidenciando a presença de inúmeros parasitos e em (D) detalhe de (C) mostrando os macrófagos intensamente parasitados (setas). Observar a proximidade dos macrófagos parasitados às células epiteliais (cabeça de seta) (HE 600x) (E,F) Corte histológico obtido em criostato mostrando células inflamatórias CD11a positivas ao redor dos anexos (fóliculo e glândulas) em (E) e (F) algumas células CD11b positivas na derme profunda (estreptoavidina-peroxidase 600x).

5- DISCUSSÃO

Leishmania são parasitos intracelulares obrigatórios que residem quase exclusivamente dentro de células mononucleares fagocitárias de seus hospedeiros vertebrados (CHANG, 1983). Estudos sobre as bases moleculares da ligação e internalização de promastigotas nos macrófagos *in vitro* têm demonstrado que esta interação é mediada por receptores específicos presentes na superfície dos macrófagos. (KANE & MOSSER, 2000; OLIVIER et al., 2005; CAMPAGNE, 2007). Na relação *L. major* com monócitos humanos e murinos foi descrito o papel predominante do receptor CD11b/CD18 (CR3), em relação aos outros receptores pertencentes à família das integrinas $\beta 2$ (CD11a/CD18 ou LFA-1 e CD11c/CD18 ou p150,95), na ligação do parasito aos macrófagos. Adicionalmente, a habilidade do parasito em fixar o complemento presente no soro do hospedeiro aumenta a internalização via receptor CR3 e a sobrevivência do parasito dentro dos macrófagos, nesses modelos (MOSSER & EDELSON, 1985; MOSSER et al., 1992; ROSENTHAL et al., 1996). Todavia, poucos estudos foram realizados com o intuito de elucidar o papel desses receptores na adesão da *L. chagasi* aos monócitos/macrófagos, no modelo canino (GONÇALVES et al., 2005; SAMPAIO et al., 2007).

O cão é considerado o principal reservatório urbano de *L. chagasi*, o que torna a LVC não só um problema veterinário, mas também um grande problema de saúde pública (ALVAR, 2004). O tratamento do cão infectado inclui drogas potencialmente tóxicas, sendo que, em alguns países como o Brasil, o sacrifício de animais infectados é uma das medidas adotadas para o controle da doença (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A utilização de novas formulações no tratamento da LVC vem sendo estudada por vários pesquisadores (VALADARES et al., 2001; COSTA VAL et al., 2004) com resultados promissores. As formulações lipossomais surgiram como uma estratégia promissora para o tratamento da LVC, uma vez que aumentam consideravelmente a concentração da droga nos órgãos ricos em células do sistema monocítico fagocitário, órgãos estes ricos em parasitos (ALVAR et al., 2004). Sabe-se que a capacidade do lipossoma de direcionar a droga para os órgãos alvos está relacionada com a sua capacidade de ser rapidamente eliminado da corrente sanguínea pelas células mononucleares. O lipossoma é capaz, ainda, de ativar o complemento e ao ser opsonizado por fragmentos de C3, particularmente C3b e C3bi se liga aos receptores presentes na superfície dos monócitos (DEVINE & BRADLEY, 1998), semelhante ao que ocorre na interação *Leishmania*-células mononucleares.

Assim, esse trabalho visa avaliar o impacto do tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, em parâmetros imunológicos e histopatológicos, bem

como na carga parasitária de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, submetidos à múltiplas doses desse fármaco.

5.1 – Análise da expressão dos receptores CD11a,b,c/CD18 nos monócitos provenientes do sangue periférico.

Neste estudo observamos uma significativa expressão de CD11a e CD11b na superfície dos monócitos provenientes do sangue periférico, o que já era esperado, uma vez que estas moléculas de adesão são constitutivamente expressadas na superfície dos leucócitos (HUGHES & PFAFF, 1998). Entretanto, a expressão de CD11c, na superfície dos monócitos de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* foi insignificante, sugerindo não ter este receptor grande importância na modulação da resposta imune na LVC. Apesar do tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos aparentemente não ter influenciado a expressão de CD11a, ele foi capaz de aumentar a expressão de CD11b na superfície dos monócitos provenientes do sangue periférico. Entretanto, esse aumento não se correlacionou com o quadro clínico apresentado pelos animais.

A ativação das integrinas está relacionada com modificações conformacionais na estrutura das proteínas. Esse processo, fundamental na atuação dos receptores, é frequentemente mediado por sinalizações intracelulares que modificam a afinidade desses por seus ligantes, processo conhecido como “modulação da afinidade” (HUGHES & PFAFF, 1998). Sabe-se que os lipossomas administrados intravenosamente possuem a capacidade de ativar o complemento e as opsoninas ao adsorverem-se na superfície das vesículas, são capazes de mediar sua endocitose pelos macrófagos. Essa endocitose mediada por receptor facilita a internalização dos lipossomas pelo macrófago com subsequente formação de endossoma/lisossomas. Uma vez dentro destes vacúolos os lipossomas sofrem a ação do pH ácido do meio liberando seu conteúdo no vacúolo ou no meio intracelular (MOGHIMI & RAJABI-SIAHBOOMI, 2000). Assim, além de avaliar a expressão do receptor, o estudo sobre a ação do antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos sobre as sinalizações intracelulares responsáveis pela ativação destes receptores (CD11a,b) faz-se necessário, para o melhor entendimento da atuação desta formulação na modulação da resposta imune.

5.2 - Análise da expressão dos receptores CD11a,b/CD18 nos monócitos provenientes do sangue periférico, após interação com *L. chagasi in vitro*.

Ao avaliarmos a interação *L. chagasi* – monócitos caninos, observamos que o aumento do número de *Leishmania* aderidas à superfície dos monócitos relacionou-se com a diminuição da expressão de CD11b, nas células com dupla marcação. Estes resultados sugerem que o receptor CR3 é importante na adesão da forma promastigota de *Leishmania* aos monócitos, no modelo canino, corroborando com o observado por vários autores, em estudos realizados no cão (GONÇALVES et al., 2005; SAMPAIO et al., 2007) e em outros modelos (BRAY, 1993; MOSSER, et al., 1992; DE ALMEIDA, 2003). Em nosso estudo, observou-se que a quantidade de *L. chagasi* aderida à superfície dos monócitos, bem como a diminuição da expressão de CD11b na superfície dos mesmos, correlacionou-se positivamente com o agravamento do quadro clínico sugerindo que a internalização dos parasitos via receptor CD11b/CD18 é importante para o desenvolvimento da doença. De fato, Mosser & Edelson (1987), ao estudarem a ligação de *L. major* em macrófagos murinos, observaram que a adesão ao receptor CR3 é vantajosa para o parasito, uma vez que não ativa a explosão respiratória da célula, aumentando a sobrevivência do mesmo.

Já é consenso na literatura que a interação *Leishmania*-fagócitos mononucleares se dá através de ligações envolvendo moléculas de superfície do parasito e receptores de membrana das células mononucleares. A opsonização do parasito com fatores sorológicos (opsoninas) derivados do hospedeiro facilita esta interação, em algumas espécies. Vários autores relatam a importância desta opsonização no modelo murino e humano (BLACKWELL, 1985; MOSSER et al., 1992; MOSSER et al., 1993). Gonçalves et al. (2005) ao estudar a ligação de *L. chagasi* em macrófagos peritoneais de cães observaram maior adesão do parasito na presença de soro deficiente de fator C5 do complemento. Mais recentemente, Sampaio et al. (2007) avaliaram a adesão e internalização de promastigotas de *L. chagasi* – fagócitos mononucleares em cães naturalmente e experimentalmente infectados e confirmaram a importância da opsonização no modelo canino. Nossos resultados reforçam os achados da literatura, uma vez que o número de parasitos aderidos à superfície dos monócitos provenientes do sangue periférico foi influenciado pela presença do soro deficiente de fator C5 do complemento. Adicionalmente, observamos que o tratamento com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos foi capaz de diminuir a adesão das promastigotas opsonizadas de *L. chagasi* aos monócitos caninos, 60 dias após o término do tratamento, ao contrário do observado nos outros grupos. Este resultado tem grande relevância na modulação da resposta imune a favor do hospedeiro, uma vez que a quantidade de *Leishmania* ligada aos monócitos se correlacionou com o agravamento da doença.

O tratamento com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas foi capaz de modular a expressão de CD11a na superfície dos monócitos, em ensaios realizados *in vitro*. Entretanto, a formulação lipossomal vazia, também foi capaz de modular a expressão tanto de CD11a quanto de CD11b nos ensaios de interação realizados *in vitro*. Estes resultados sugerem

que estas formulações são capazes de alterar a resposta imunológica do hospedeiro frente ao parasito. De fato, alguns autores relatam o efeito imunomodulador de formulações lipossômicas (YAN et al., 2007; PERRIE et al., 2001). Entretanto, novos estudos se fazem necessários para uma melhor compreensão da atuação destas formulações na infecção causada por *L. chagasi*.

5.3 – Influência do tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas na expressão de moléculas MHC classe II e CD14 em monócitos provenientes do sangue periférico.

A resolução da infecção por *Leishmania* depende basicamente da habilidade do hospedeiro em articular uma resposta imune mediada por células com predomínio de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (LOCKSLEY & LOUIS, 1992). A ativação dessas células por células apresentadoras de antígenos requer a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe I ou classe II (MHC classe I ou II) na superfície e a interação de receptores e ligantes co-estimulatórios. Várias espécies de *Leishmania* têm a capacidade de interferir na indução da resposta imune protetora através de vários mecanismos, tais como a supressão de MHC classe II (*L. donovani*); internalização e degradação de moléculas MHC classe II (*L. amazonensis*); inibição do processamento antigênico (*L. major*, *L. donovani*, *L. amazonensis*), dentre outros (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1999).

Os lipossomas podem ser usados como adjuvantes imunológicos, uma vez que são hábeis em estimular a resposta imune mediada por células. As vesículas lipossomais ácido-resistentes são encaminhadas para o lisossoma, degradadas e transportadas para o endossoma, onde se combinam com moléculas de MHC classe II (FRÉZARD, 1999). Nossos resultados não demonstraram diferença significativa na expressão de MHC classe II, entre os grupos (Lp-Sb, Lp e C) nos dois momentos da análise, sugerindo que o tratamento com antimônio encapsulado em lipossomas nanométricos não foi capaz de modular a expressão destas moléculas. Resultado semelhante foi observado em relação à expressão de CD14 na superfície dos monócitos. Esta molécula está envolvida na ativação dos monócitos, possuindo papel fundamental na inicialização dos sinais de transdução, após estímulo antigênico. A expressão de CD14 parece estar relacionada com a indução de NRAMP-1 (proteína 1 de macrófago associada à resistência natural), proteína de membrana expressa exclusivamente no compartimento lisossomal de macrófagos/monócitos, associada à resistência a infecções causadas por patógenos intracelulares, incluindo *Leishmania*, no modelo murino (BELLAMY, 1999; CANONNE-HERGAUEX et al., 1999). Giunchetti et al. (2006) observaram correlação positiva entre a frequência de monócitos CD14⁺ e a intensidade da resposta inflamatória, em cães infectados com *L. chagasi*, sugerindo migração e participação destas células na reação inflamatória, na derme.

Todavia, sua contribuição na resistência ao patógeno, no modelo canino, ainda necessita ser melhor investigada.

5.4 – Influência do tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nas subclasses de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, no sangue circulante.

A importância dos linfócitos T CD4⁺ na leishmaniose canina já é um consenso. A resistência à infecção causada por *Leishmania* está associada à capacidade dos linfócitos T CD4⁺ produzirem IFN- γ que ativa os macrófagos parasitados tornando-os aptos a eliminarem os parasitos intracelulares (LIEW et al., 1989; PINELLI, 1995). Bordoiseau et al. (1997) observaram que cães naturalmente infectados com leishmaniose ativa apresentavam percentual de linfócitos T CD4⁺ significativamente menor do que os cães saudáveis. Alvar et al. (2004) observaram que o nível de linfócitos T CD4⁺ encontra-se diminuído na leishmaniose, sendo esta diminuição responsável pela patogênese e progressão da doença. Estes autores também observaram correlação direta entre os níveis de linfócitos T CD4⁺ e a resposta ao tratamento quimioterápico, em cães naturalmente infectados. Entretanto, Miranda et al. (2007), ao estudarem cães naturalmente infectados submetidos à terapia convencional com antimoniato e alopurinol, concluíram que as subpopulações de linfócitos T circulantes são similares às observadas nos cães saudáveis e que não há correlação entre o quadro clínico ou a resposta à quimioterapia e a porcentagem das diferentes classes de linfócitos. Nossos resultados reforçam os achados destes autores, uma vez que a porcentagem de linfócitos encontrados no grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos não diferiu dos valores obtidos no grupo controle. É interessante ressaltar que o grupo tratado com a formulação lipossomal vazia apresentou níveis mais baixos de linfócitos T CD4⁺ em relação ao grupo controle, 30 dias após o tratamento, indicando que esta formulação é capaz de modular a resposta imune.

O papel dos linfócitos T CD8⁺ no controle da leishmaniose visceral tem sido demonstrado em humanos (MARY et al., 1999) e camundongos (TSAGOZIS et al., 2005). Linfócitos T CD8⁺ provenientes de cães assintomáticos revelaram um efeito citolítico direto em macrófagos infectados com *L. infantum*, sendo este um mecanismo efetor na resistência à leishmaniose visceral canina (PINELLI, 1995). Reis et al. (2006) ao estudarem cães naturalmente infectados observaram que o aumento dos níveis de linfócitos T CD8⁺ se correlacionou positivamente com a melhora do quadro clínico e com a diminuição da carga parasitária, sugerindo ser esta subclasse de linfócitos T a principal característica fenotípica da doença assintomática e de cães com baixa carga parasitária. Em nosso estudo, a manutenção da porcentagem de linfócitos T CD8⁺ no grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas, aliado à observação de que a relação CD4⁺/CD8⁺ apresentou correlação positiva com o agravamento da doença reforçam a

importância dos linfócitos T CD8⁺ na resposta imune protetora, na leishmaniose visceral canina. Nossos resultados sugerem, também, que o tratamento com lipossomas teve papel importante na manutenção dos níveis de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico. Estes resultados estão de acordo com os achados de Reddy et al. (1992), ao observarem que proteínas solúveis administradas em lipossomas foram hábeis em induzir uma resposta imune relacionada com a ativação de linfócitos T citotóxicos. De fato, Moghimi & Rajabi-Siahboomi (2000) relatam que os lipossomas podem atuar como potentes adjuvantes e descrevem que após a fagocitose dos lipossomas pelas células apresentadoras, parte das proteínas e lípides lipossomais entram no citoplasma onde são processados pelo complexo proteosoma. Essas proteínas são então transportadas via transportadores específicos, para o retículo endoplasmático e complexo de Golgi e, eventualmente ligam-se às moléculas de MHC classe I e são então transportadas para a membrana plasmática para reconhecimento e ativação de células T citotóxicas.

5.5 – Alterações histopatológicas no baço e no fígado

Na leishmaniose visceral ocorre o desenvolvimento de uma resposta imune órgão-específica em dois principais órgãos alvos de infecção - o baço e o fígado. Estudos indicam que o baço, considerado local inicial da geração da resposta imune mediada por células, também parece ser o local de persistência do parasito associada com modificações imunopatológicas. Estas incluem esplenomegalia e distúrbios na arquitetura tecidual que parecem contribuir para o estado de imunocompetência do hospedeiro (STANLEY & ENGWERDA, 2007). O fígado, por sua vez, é o local onde a resolução da infecção aguda está associada ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória granulomatosa ao redor de células de Kupffer, e resistência à reinfecção. Stanley & Engwerda (2007), relatam que parece haver um delicado equilíbrio imunológico determinando respostas que efetivamente promoverão a eliminação do parasito no fígado e a persistência da infecção no baço.

Estudos realizados por Sanchez et al. (2004) em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* demonstraram diferenças na resposta imunológica observada no baço e fígado. Estes autores relatam que no baço a resposta imune dos cães sintomáticos e assintomáticos foi muito similar. No fígado, entretanto, os cães assintomáticos mostraram uma imunidade efetiva, com granulomas bem formados contendo células T efectoras e numerosas moléculas ativadoras, ao passo que, os animais sintomáticos apresentavam granulomas não organizados compostos por infiltrado de células T, numerosas células de Kupffer parasitadas e baixa expressão de moléculas ativadoras. Estes autores também observaram menor parasitismo no baço, em relação ao observado no fígado. Esses resultados, no entanto, contrastam com os achados de Tafuri et al. (1996) e Sant'Ana et al. (2007) que ao estudarem cães naturalmente e experimentalmente

infectados, observaram granulomas intralobulares bem organizados, no fígado de todos os animais estudados, independente da forma clínica.

Lima et al. (2007) também constataram diferenças na resposta imunológica entre estes órgãos. Estes autores observaram alta carga parasitária no baço de cães sintomáticos, sendo que esta apresentou correlação positiva com a expressão de CR3, sugerindo que as células mononucleares esplênicas podem servir para perpetuar a infecção intracelular. Entretanto, no fígado, os animais assintomáticos apresentaram maior expressão de CR3 e menor carga parasitária em paralelo com a presença de grande número de granulomas. Estes resultados reforçam a idéia de que as células mononucleares presentes em cada órgão apresentam comportamentos diferenciados frente ao parasito.

Em nosso estudo, observamos que a carga parasitária no baço foi relativamente maior do que a encontrada no fígado, embora não tenhamos encontrado correlação entre a expressão de CD11a,b e o parasitismo. O tamanho da amostra pode estar relacionado com a discrepância entre nossos resultados e os relatados por Lima e colaboradores (2007), que avaliaram 76 animais. O tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos influenciou positivamente a carga parasitária, mas não alterou a expressão de CD11a,b no baço. Os cães que receberam tratamento com lipossomas vazios mostraram maior expressão de CD11b nos macrófagos esplênicos e maior carga parasitária, embora esta não tenha sido estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. A esplenomegalia é um achado freqüente na leishmaniose canina e em nosso estudo constatamos que o tratamento com a formulação lipossomal foi capaz de minimizar esta alteração. Observou-se também que o baço dos cães submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas apresentou-se mais reativo, uma vez que o quadro de hiperplasia e hipertrofia da polpa branca foi mais intenso. Esta maior reatividade pode estar relacionada com a menor carga parasitária observada neste grupo.

No fígado, a presença de granulomas intralobulares foi um achado freqüente na grande maioria dos cães (96,4%), sendo que o grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos apresentou menor número destes, associado à um quadro de inflamação portal menos intenso. Sabe-se que a inflamação granulomatosa, é uma reação histopatológica distinta, induzida por vários microorganismos, incluindo *Leishmania*. A eficácia e a intensidade da resposta granulomatosa é determinada tanto por fatores do parasito quanto do hospedeiro (MURRAY, 2001). A diminuição da carga parasitária, observada no grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, provavelmente está relacionada com a diminuição do estímulo inflamatório e conseqüentemente com a presença de menor número de granulomas. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Giunchetti et al. (2007), que ao estudarem cães naturalmente infectados com *L.*

chagasi observaram que a intensidade das alterações inflamatórias estava associada com a maior carga parasitária tecidual.

5.6 – Alterações histopatológicas no linfonodo cervical

Linfadenopatia é usualmente definida como um aumento do tamanho dos linfonodos (expansão dos linfonodos) que pode aparecer como uma alteração localizada ou generalizada. Na LVC a linfadenopatia é um achado clínico freqüente (CIARAMELLA et al., 1997; COSTA VAL, 2004; LIMA et al., 2004). Nossos resultados estão de acordo com estes autores, pois a linfadenopatia, especialmente dos linfonodos cervicais, foi o sinal clínico mais prevalente verificado nos cães deste experimento. Lima et al. (2004) relatam que a linfadenopatia, observada em cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, relaciona-se principalmente com a hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos medulares (cordões e seios). Adicionalmente, esses autores observaram que os linfonodos cervicais apresentam-se mais reativos que os axilares e poplíteos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Ciaramella et al. (1997). Segundo estes autores a maior reatividade dos linfonodos cervicais deve-se à sua posição anatômica, uma vez que estes drenam as regiões cutâneas e subcutâneas da cabeça e orelha.

O peso relativo do linfonodo cervical e as alterações histopatológicas observadas nos animais analisados, não sofreram influência do tratamento com antimoníato de meglumina encapsulado em lipossomas. Entretanto, esta formulação foi capaz de diminuir significativamente a carga parasitária neste órgão.

Observamos, também, que o parasitismo correlacionou-se positivamente com a linfadenite capsular e com o quadro de hipertrofia e hiperplasia dos nódulos linfóides, sugerindo que a reatividade dos linfócitos está associada à maior estimulação antigênica decorrente da carga parasitária. De fato, os centros germinativos são histologicamente definidos como agregados de células blásticas constituindo áreas de células B, no tecido linfóide, após estimulação antigênica. Eles estão associados com o desenvolvimento de células B de memória e células plasmáticas, especialmente secundário a IgG e IgA (KRAAL et al., 1982). Sabe-se que na LVC a resposta imune humoral desenvolvida é bastante intensa, traduzindo-se na presença de elevados títulos de anticorpos anti-*Leishmania* (ALVAR et al., 2004).

5.7 – Alterações histopatológicas na medula óssea

A medula óssea é um dos órgãos alvos do parasito, por ser rico em células mononucleares. Na LVC a alteração comumente observada é a hiperplasia, podendo ou não conter parasitos (KEENAN et al., 1984). Nossos resultados estão de acordo com os dados da

literatura, uma vez que a maioria dos cães apresentou aumento da celularidade, principalmente da série monocítica.

A utilização de formulações lipossomais no tratamento da leishmaniose visceral canina vem sendo estudada por vários autores (CHAPMAN et al., 1984; COLLINS et al., 1993; VALLADARES et al., 1997, 2001). Frézard et al. (2000) desenvolveram um novo método de encapsulamento de antimoniato de meglumina em lipossomas, resultando em lipossomas com diâmetro médio de 1,4 µm. O estudo da biodistribuição do antimônio, em cães submetidos a tratamento com essa nova formulação, mostrou que a concentração de antimônio foi mais baixa na medula óssea em relação àquela observada no baço e no fígado. Esta diferença foi atribuída ao tamanho dos lipossomas (SCHETTINI et al., 2003). Visando a obtenção de lipossomas de tamanho reduzido, Schettini et al. (2006) modificaram o método desenvolvido inicialmente por Frézard et al. (2000), obtendo uma nova formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas com diâmetro de 400 nm. Esta redução da escala micrométrica para a escala nanométrica propiciou acúmulo de aproximadamente três vezes mais antimônio na medula dos cães com LV. Entretanto, ao avaliarmos o efeito curativo dessa nova formulação, constatamos que ela não foi capaz de alterar significativamente o parasitismo na medula óssea entre os cães analisados.

5.8 – Alterações histopatológicas na pele

As anormalidades na pele são consideradas as manifestações clínicas mais usuais na LVC (FERRER, 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; XAVIER et al., 2006). Sinais clínicos como ulceração crônica principalmente localizada nas orelhas e membros, onicogribose e descamação são freqüentes (CIARAMELLA et al., 1997). Entretanto, em nosso estudo, embora de grande freqüência, o acometimento cutâneo observado nos cães, não foi o sinal clínico mais prevalente.

As manifestações histopatológicas usualmente observadas na pele de cães infectados com *Leishmania* consistem principalmente de presença de infiltrado inflamatório com graus variados de intensidade. De fato, Solano-Gallego et al. (2004) relatam que a lesão mais comumente observada em biópsias de pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania* foi dermatite perifolicular principalmente ao redor dos anexos, com predomínio de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Em estudo semelhante, os dados obtidos por dos-Santos et al. (2004) confirmam os achados de Solano-Gallego et al. (2004) e adicionalmente relatam a formação de granulomas associada ao grau de parasitismo. Em nosso estudo, todos os cães analisados apresentaram inflamação na pele com graus variados de intensidade, confirmando dados da literatura. Entretanto nenhum granuloma foi observado nos animais analisados. Esses resultados estão de acordo com o relatado por Giunchetti et al. (2006).

A intensidade das manifestações histopatológicas observadas nos cães analisados, não sofreu influência do tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos. Essa formulação, também não foi capaz de alterar significativamente o grau de parasitismo, embora tenhamos observado uma tendência à diminuição da carga parasitária no grupo submetido ao tratamento, que se refletiu numa redução significativa da capacidade infectante destes animais para fêmeas de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (RIBEIRO, 2007). Estes resultados devem ser analisados com bastante critério, uma vez que a pele é considerada um importante reservatório do parasito tanto em cães saudáveis quanto em cães doentes infectados com *Leishmania* tendo, portanto, grande importância epidemiológica (ABRANCHES et al., 1991; SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

Em resumo, ao avaliarmos as células provenientes do sangue periférico, nossos resultados sugerem ter o receptor CD11b/CD18 maior importância na interação *Leishmania*-hospedeiro do que CD11a/CD18 e CD11c/CD18. Observamos que o tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos aumentou a expressão de CD11b na superfície dos monócitos provenientes do sangue periférico, antes da interação com *L. chagasi in vitro*, 60 dias após o tratamento. Por outro lado, após os mesmos 60 dias, houve uma diminuição da adesão de promastigotas opsonizadas aos monócitos, após interação com *L. chagasi in vitro*. O tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos não alterou a expressão de MHC classe II nos monócitos caninos e nem a frequência de linfócitos T CD4⁺, no sangue periférico, mas foi capaz de determinar níveis mais elevados de linfócitos T CD8⁺, por um período prolongado. O lipossoma vazio foi capaz de modular a resposta imune, alterando a expressão de CD11a e CD11b na superfície dos monócitos, bem como diminuindo a frequência de linfócitos T CD4⁺.

Ao avaliarmos os órgãos dos animais, observamos que a carga parasitária diminuiu significativamente, no grupo tratado com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, no baço, fígado e linfonodo cervical. Todavia, esta diminuição não foi significativa na medula óssea e na pele. O baço dos animais submetidos a essa formulação apresentou-se mais reativo, ao passo que no fígado as alterações histopatológicas foram menos intensas. A expressão de CD11a e CD11b, nas células teciduais foi similar entre os grupos, em todos os órgãos analisados, com exceção do baço. Nesse órgão, o tratamento com a formulação lipossomal vazia diminuiu a expressão de CD11b. Esses resultados mostram que esse protocolo de tratamento foi capaz de reduzir a carga parasitária e, em adição, estimular uma resposta imune órgão-específica.

Considerando a ampla apresentação clínica na LVC, com graus variados de morbidade, o estudo dos mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imunológica dos cães infectados, após o tratamento quimioterápico, é relevante para se estabelecer os padrões de mecanismos imunoprotetores e os eventos imunopatológicos que possam ocorrer. O conhecimento mais detalhado da interação *Leishmania*-hospedeiro tem grande importância no delineamento de novas estratégias profiláticas e terapêuticas contra essa infecção.

6- CONCLUSÕES

O presente estudo nos permitiu concluir que:

- O aumento da expressão de CR3 observada nos monócitos de cães tratados com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos não se correlacionou com maior adesão de *Leishmania chagasi* aos monócitos caninos *in vitro*.
- A manutenção dos níveis de linfócitos T CD8⁺, no sangue periférico dos cães submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, indica que este protocolo foi capaz de estimular uma resposta imune celular.
- Esse protocolo de tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço, fígado e linfonodos, mas não alterou a expressão de CD11a,b/CD18 nas células teciduais.
- Esse protocolo de tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos foi capaz de alterar o quadro histopatológico observado no baço e no fígado.
- Este protocolo de tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos ainda não foi capaz de reduzir o parasitismo na medula óssea e na pele.

7- PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante das limitações técnicas, financeiras e operacionais vivenciadas no decorrer deste trabalho, alguns aspectos não puderam ser devidamente estudados. No entanto, faz-se necessário ressaltá-los, com o intuito de abrir novas perspectivas para futuros projetos que porventura surgirão a partir dos resultados obtidos neste estudo. São eles:

- Avaliação imunológica de todos os cães antes do tratamento e no momento da necropsia, de modo a obter correlação individual entre os valores obtidos no sangue e nos tecidos.
- Bloqueio dos receptores, antes de incubação com *Leishmania in vitro*, para melhor avaliação da importância de cada receptor e das interações que porventura possam existir entre eles.
- Avaliação da expressão de MHC classe II e de outras moléculas co-estimulatórias nos monócitos após interação com *Leishmania in vitro*.
- Avaliação da expressão de MHC classe II, dos receptores CD11a,b,c e de antígenos CD4 e CD8 nas células teciduais, utilizando metodologias mais sensíveis, como citometria de fluxo.
- Avaliação do parasitismo e das alterações histopatológicas no rim e no pulmão dos cães submetidos à terapia lipossomal.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SANTOS GOMES, G.M.; JANZ, G. Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol*, v.77, p.557-561, 1991.
- ALENCAR, J.E. Calazar Canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 342 pg, 1959.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell. Sci.*, v.112, p.2993-3002, 1999.
- ALTIERI, D.C.; EDGINTON, T.S. The saturable high affinity association of factor X to ADP-stimulated monocytes defines a novel function of the receptor. *J. Biol. Chem.*, v.263, p.7007-7015, 1988.
- ALTIERI, D.C. ; AGBANYO, F.R. ; PLESCIA, J. ; GINSBERG, M.H. ; EDGINGTON, T.S. ; PLOW, E.F. A unique recognition site mediates the interactions of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Biol. Chem.*, v.265, p.12119-12122, 1990.
- ALVAR, J.; CANAVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v.57, p.2-64, 2004.
- ALVING, C.R. Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. *Parasitol. Today*, v.2, p.101-107, 1986.
- ANDERSON, D.C.; BUCKNER, R.G.; GLENN, B.L.; MAC VEAN, D.W. Endemic canine leishmaniasis. *Vet. Pathol.*, v.17, p.94-96, 1980.
- ANDREW, D.P.; SPELLBERG, J.P.; TAKIMOTO, H.; SCHMITS, R.; MAK, T.W.; ZUKOWSKI, M.M. Transendothelial migration and trafficking of leukocytes in LFA-1-deficient mice. *Eur. J. Immunol.*, v.28, p.1959-1969, 1998.
- ARNAOUT, M.A.; TODD, R.F.; DANA, N. ; MELAMED, J. ; SCHOLSSMAN, S.F. COLTEN, H.R. Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G- coated particles and of C3b binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mo1). *J. Clin. Invest.*, v.72: p.171-179, 1983.
- BACHMANN, M.F.; MCKALL-FAIENZA, K.; SCHMITS, R.; BOUCHARD, D.; BEACH, J.; SPEISER, D.E.; MAK, T.W.; OHASHI, P.S. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity.*, v.7, p.549-557, 1997.

BANETH, G.; SHAW, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.106, p.315-324, 2002.

BANGHAM, A.D. Liposomes: Realizing their promise. *Hosp. Pract.*, v.15, p.51-62, 1992.

BASU, M.K. & RAY, M. Macrophage and *Leishmania*: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol.*, v.31, p.145-54, 2005.

BELLAMY, R. The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes Infect*, v.1, p.23027,1999.

BOGDAN, C. & ROLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today*, v.15, p.22-28, 1999.

BOURDOISEAU, G., MARCHAL, T., MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymphonodes. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.9, p.439-440, 1997.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE – www.saude.gov.br – acesso em 28/08/06.

BRAY, R.S.; Leishmania: chemotaxic response of promastigotes and macrophages in vitro. *J. Protozool.*, v.30, p.322-329, 1983.

BRENER, Z. *Calazar canino em Minas Gerais*. 1957. 90 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1957.

BRYCESON, A.D.M. Leishmaniasis. In COOK, G.C. (Ed.). *Manson's Tropical Diseases*. London: WB Saunders Company, 1996. p.1213-1245.

CAMPAGNE, M.L.; WIESMANN, C.; BROWN, E.J. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell. Microbiol.*, v.9, p.2095-2102, 2007.

CANONNE-HERGAUX, F.; GRUENHEID, S.; GOVONI, G.; GROS, P. The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, v.111, p.283-289, 1999.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; CASTRO, G.O; FERREIRA, L.C. & ROMANA, C. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, v.32, p.321-385, 1937.

CHAGAS, E.; CUNHA, AM.; FERREIRA, L.C.; DEANE, L.M.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F.N.; PAUMGARTEN, M.J.V. & SÁ, B. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da

Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, v.33, p.89-229, 1938.

CHANG, K.P. *Leishmania donovani*: Promastigote -macrophage surface interactions in vitro. *Exp. Parasitol.*, v.48, p.175-189, 1979.

CHAPMAN, W.L.Jr.; HANSON, W.L.; ALVING, C.R.; HENDRICKS, L.D. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated meglumine antimonate in the dog. *Am. J. Vet. Res.*, V.45, P.1028-1030, 1984.

CIARAMELLA, P; OLIVA, G; DE LUNA, R; GRADONI, L; AMBROSIO, R; CORTESE, L; SCALONE, A & PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *L. infantum*. *Vet. Rec.*, v.141, p.539-543, 1997.

COLLINS, M.; CARTER, K.C.; BAILLIE, A.J.; O'GRADY, J. The distribution of free and non-ionic vesicular sodium stibogluconate in the dog. *J. Drug. Target.*, V.1, P.133-142, 1993.

COSTA VAL, A.P. Tratamento da leishmaniose visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas (Doutorado). Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2004, 125p.

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

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol.Pathol.*, v.72, p.132-141, 2002.

De ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M Leishmanial infection: analysis of its first steps. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, V.98, P.861-870, 2003.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*, v.47, p.75-87, 1955.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.4, p.149-212, 1962.

DEVINE, D.V.; BRADLEY, A.LJ. The complement system in liposome clearance: Can complement deposition be inhibited? *Adv. Drug Del. Rev.*, v.32, p.19-29, 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v.27, p.305-318, 2004.

DIAMONT, M.S.; STAUNTON, D.E.; de FOUEROLLES, A.R.; STACKER, S.A.; GARCIA - AGUILAR, J.; HIBBS, M.L.; SPRINGER, T.A. Icam-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b\CD18). *J. Cell Biol.*, v.111, p.3129-3139, 1991.

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Notes sur la leishmaniose viscerale canine. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.28, p.426-431, 1935.

Dos-SANTOS, W.L.; DAVID, J.; BADARO, R.; de-FREITAS, L.A. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. *Parasitol. Res.*, v.92, p.89-94, 2004.

DUARTE, M.I.S.; LAURENTI, M.D.; BRANDAO NUNES, V.L.; REGO JUNIOR, A.F.; OSHIRO, E.T.; CORBETT, C.E. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v.28, p.431-436, 1986.

FAURÉ-BRAC, G. La leishmaniose canine. *Rev. Path. Comp. Hyg. Gén.*, v.33, p.648-649, 1933.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FRRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.56, p.319-327, 1997.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: Moving towards a solution, 2, 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sumene, (s. ed.), 2002. P. 21-24.

FONT, A.; CLOSA, J. Ultrasonographic localization of a caudal vena thrombus in a dog with leishmaniasis. *Vet. Radiol. Ultrasound.*, v.38, p.394-396, 1997.

FRÉZARD, F. Liposomes: from bipophysics to the design of peptide vaccines. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, p.181-189, 1999.

FRÉZARD, F.; MICHALICK, M.S.M.; SOARES, C.F. & DEMICHELI, C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.33, p.841-846, 2000.

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

GILLESPIE, R.D.; MBOW, M.L.; TITUS, R.G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.*, v.22, p.319-331, 2000.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Relation between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Path.*, v.135, p.100-107, 2006.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, 2007

GOMES-PEREIRA, S.; RODRIGUES, O.R.; SANTOS-GOMES, G.M. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. *Immuno. Lett.*, v. 95, p. 63-70, 2004.

GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L.; MELO, M.N.; RASO, P.; TAFURI, W.L. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.45, p.153-158, 2003.

GONÇALVES, R.; VIEIRA, E.R.; MELO, M.N.; GOLLOB, K.J.; MOSSER, D.M.; TAFURI, W.L. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. infantum chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC. Infect. Dis.*, v.24, p.39, 2005.

GREGORIADIS, G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today*, v.11, p.89-97, 1990.

GUARGA, J.L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M.J.; PERIBÁÑEZ, M.A. & CASTILLO, J.A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis, *Vet. Immun. Immunopat.*, v.88, p.13-20, 2002.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K. & BRYCESON, A.D.M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.*, v.2, p.494-501, 2002.

HALL, B.F.; JOINER, K.A. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Imunoparasitol. Today*, v.12, p.A22-A27, 1991.

HANDMAN E, BULLEN DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 332-334, 2002.

HILL, J.O.; AWWAD, M.; NORTH, R.J. Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. *J. Exp. Med.*, v. 169, p. 1819-1827, 1989.

HOGG, N.; HENDERSON, R.; LEITINGER, B.; MCDOWALL, A.; PORTER, J.; STANLEY, P. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol. Rev.*, v. 186, p. 164-171, 2002.

HOWARD, D.R.; EAVES, A.C.; TAKEI, F. Lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) is involved in B cell activation. *J. Immunol*, v.136, p.4013-4018, 1986.

HUGHES, P.E.; PFAFF, M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol.*, v.8, p.359-364, 1998.

IVERSSON, L.B.; CAMARGO, M.E.; VILLANOVA, A.; REISHMANN, M.I.; ANDRADE, E.A.; TOLEZANO, J.E. Serological survey for research on visceral leishmaniasis in an urban dog population of the municipality of São Paulo, Brazil (1979-1982). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.25, p.310-317, 1983.

JENEFER, M. ; BLACKWELL, R. ; EZEKOWITZ, A.B. ; ROBERTS, M. B. ; CHANNON, J.Y.; SIM, R.B.; GORDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.*, v.162, p.324-331, 1985.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin. Hematol.*, v.7, p.26-31, 2000.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H.K.; JOHNSON, A. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.*, v.2, p.74-79, 1984.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v.65, p.37-42, 1979.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v.65, p.37-42, 1990.

KRAAL, G.; WEISSMAN, I.L.; BUTCHER, E.C. Germinal centre B cells: antigen specificity and changes in heavy chain class expression. *Nature*, v.298, p.377-379, 1982.

LAINSON R, RYAN L, SHAW JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.82, p. 421-424, 1987.

LAMBRIS, J.D. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol. Today*, v.9, p.387-393, 1988.

LANG, T., de CHASTELLIER, C.; FREHEL, C.; HELLIO, R.; METEZEAU, P.; LEÃO, S.S.; ANTOINE, J.C. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J. Cell. Sci.*, v. 107, p.69-82, 1994.

LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur um protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. & Mesn.). Parasite d' une fièvre de l'Ind. *Com. R. Hébr. Séanc. Acad. Sci.*, v.137, p.957-961, 1903.

LIEW, F.Y. Functional heterogeneity of CD4+ T cells in leishmaniasis. *Immunol. Today*, v. 10, p. 40-45, 1989.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymphnodes. *Acta. Trop.*, v.92, p.43-53, 2004.

LIMA, W.G.; OLIVEIRA, P.S.; CALIARI, M.V.; GONÇALVES, R.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.117, p.129-136, 2007.

LIU, F.; LIU, D. Serum independent liposome uptake by mouse liver. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1278, p.5-11, 1996.

LOCKSLEY, R.M.; LOUIS, J.A. Immunology of leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.*, v.4, p.413-418, 1992.

MACDOWELL, M.A. AND SACKS, D. Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. *Current Opinion in Microbiol.*, v.2, p.438-443, 1999.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis in control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.82, p.566-567, 1988.

MARCUSSEN, N.; VETNER, M.; KRISTENSEN, H.M. Interstitial nephritis and glomerulonephritis in visceral leishmaniasis in a dog. A case report, *APMIS*, v.97, p.1137-1140, 1989.

MARGONARI, C.; FREITAS, C.R.; RIBEIRO, R.C.; MOURA, A.C.M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A.H.; PESSANHA, J.P.; DIAS, E.S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, V.101, P.31-38, 2006.

MARTH, T. & KELSALL, B.L. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J. Exp. Med.*, v.185, p.1987-1995, 1997.

MARY, C.; AURIAULT, V.; FAUGERE, B.; DESSEIN, A.J. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infect Immun.*, v. 67, p.5559-5566, 1999.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; RANGEL JR, F.B. & TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.80, p.349-357, 1985.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The stranger case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today*, v.16, p.188-189, 2000.

MIRANDA, S.; MARTORELL, S.; COSTA, M.; FERRER, L.; RAMIS, A. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Vet. Parasitol.*, v.44, p. 251-260, 2007.

MOGHIMI, S.M.; RAJABI-SIAHBOOMI, A.R. Recent advances in cellular, sub-cellular and molecular targeting. *Adv. Drug Del. Rev.*, v. 41, p.129-133, 2000.

MOSSER, D.M.; EDELSON, P.J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.*, v.135, p.2785-2789, 1985.

MOSSER, D.M.; EDELSON, P.J. The third component of complement C3 is responsible for in the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*, v.327, p.329-331, 1987.

MOSSER, D.M.; SPRINGER, T.A.; DIAMOND, M.S. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to human leukocyte integrin MAC-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.*, v.116, p.511-520, 1992.

MOSSER, D.M.; ROSENTHAL, L.A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin. Cell. Biol.*, v.4, p.315-322, 1993.

MOY, V.T.; BRIAN, A.A. Signaling by lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) in B cells: enhanced antigen presentation after stimulation through LFA-1. *J. Exp. Med.*, v.175, p.1-7, 1992.

MULLER, I.; PEDRAZZIN, I.T.; KROPF, P.; LOUIS, J.; MILON, G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. *Int. Immunol.*, v.3, p.587-597, 1991.

MURRAY, W.; DELPH-ETIENNE, S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanism. *J. Infect. Dis.*, v.181, p.795-799, 2000.

MURRAY, H.W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 82, p.249-267, 2001.

MYONES, B.L.; DALZEL, L.J.G.; HOGG, N.; ROSS, G.D. Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J. Clin. Invest.*, v.82, p. 640-651, 1988.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine canine du Kala-azar. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.1. p.299-301,, 1908)

NICOLLS, M.R.; GILL, R.G. LFA-1(CD11a) as a therapeutic target. *Am. J. Transplant.*, v. 6, p. 27-36, 2006.

NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M.A.; SERRANO, E.F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.*, v.45, p.33-47, 1992.

OLIVA, G.; FOGLIA MANZILLO, M.; PAGANO, A. Canine leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols. *Parassitol.*, v.46, p.231-234, 2004.

OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.18, p.293-305, 2005.

PATARROYO, M.; PRIETO, J.; RINCON, J.; TIMONEN, T.; LUNDBERG, C.; LINDBOM, L.; ASJO, B.; GAHMBERG, C.G. Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology. *Immunol Rev.*, v.114, p.67-108, 1990.

PEARSON, R.D.; STEIGBIGEL, R.T. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J. Immunol.*, v.125, p.2195-2199, 1980.

PEREZ, O.D.; MITCHELL, D.; JAGER, G.C.; SOUTH, S.; MURRIEL, C.; MCBRIDE, J.; HERZENBERG, L.A.; KINOSHITA, S.; NOLAN, G.P. Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat. Immunol.*, v. 4, p. 1083-1092, 2003.

PERRIE, Y.; FREDERIK, P.M.; GREGORIADIS, G. Liposome-DNA vaccination; the effect of vesicle composition. *Vaccine*, v.19, p.3301-3310, 2001.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DeL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur. J. Immunol.*, v.25, p.1594-600, 1995.

POSTIGO, A.A.; CORBI, A.L.; SANCHEZ-MADRID, F.; DE LANDAZUR, I. M.O. Regulated expression and function of CD11c/CD18 integrin on human B lymphocytes. Relation between attachment to fibrinogen and triggering of proliferation through CD11c/CD18. *J. Exp. Med.*, v.174, p. 1313-1322, 1991.

PUENTES, S.M.; DWYER, D.M.; BATES, P.A.; JOINER, K.A. Binding and release of C3 from *L. donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.*, v.143, p.3743-3749, 1989.

RAMOS, O.F.; KAI, C.; YEFENOF, E.; KLEIN, E. The elevated natural killer sensitivity of targets carrying surface-attached C3 fragments require the availability of the iC3b receptor (CR3) on the effectors. *J. Immunol.*, v.140, p. 1293-1243, 1988.

REDDY, R.; ZHOU, F.; NAIR, S.; HUANG, L.; ROUSE, B.T. In vivo cytotoxic T lymphocytes induction with soluble proteins administered in liposomes. *J. Immunol.*, v.148, p.1585-1589, 1992.

REINER, N.E.; Ng, W.; McMASTER, W.R. Parasite-accessory cell-interactions in murine leishmaniasis. 2. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class-I and class II major histocompatibility complex gene-products. *J. Immunol.*, v.138, p.1926-1932, 1987.

REIS, A.B. *Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi, portadores de diferentes formas clínicas da infecção*. 2001. 180f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; GUERRA, L.L.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.*, v.146, p.303-311, 2006.

RIBEIRO, J.M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann. Vet. Entomol.*, v.32, p.463-478, 1987.

RIBEIRO, R.R. Biodistribuição, toxicidade e eficácia terapêutica da formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937). 2007. 149 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

RODRIGUES, M.M.; BOSCARDIN, S.B.; VASCONCELOS, J.R.; HIYANE, M.I.; SALAY, G.; SOARES, I.S. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v.75, p.443-468, 2003.

ROSA, R.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O.R.; SANTOS-GOMES, G.M. *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4+ and CD8+ T cells. *Acta Trop.*, v.97, p.309-317, 2006.

ROSENTHAL LA, SUTTERWALA FS, KEHRLI ME, MOSSER DM. Leishmania-major-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infection and Immunity*, v.64, p.2206, 1996.

ROSS, G.D. Analysis of the different types of leukocyte membrane complement receptors and their interaction with the complement system. *J. Immunol. Methods*, v.37, p.197-211, 1980.

ROSS, G.D.; MEDOF, M.E. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. *Adv. Immunol.*, v.37, p.217-267, 1985.

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

ROTHLEIN, R.; SPRINGER, T.A. Complement receptor type three-dependent degradation of opsonized erythrocytes by mouse macrophages. *J. Immunol.*, v. 135, p.2668-2672, 1985.

RUSSEL, D.G.; TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol. Today*, v.10, p.328-332, 1989.

RUSSEL, D.G.; WRIGHT, S.D. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *J. Exp. Med.*, v.168, p.279-292, 1988.

SAMPAIO, W.M.; MOURA, E.P.; ARRUDA, F.C.S.; RIBEIRO, R.R.; CÍNTIA, F.A.; MELO, F.A.; FERNANDES, A.P.S.M.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocytes-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *BMC Vet. Res.*, v.3, p.1-9, 2007.

SANCHEZ, M.A.; DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F.J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.70, p.618-624, 2004.

SANT'ANA, J.A.P.; LIMA, W.G.; OLIVEIRA, M.R.; SIMÕES, L.A.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, Wg. L. Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2007 (IN PRESS).

SANTOS, W.L.C., BADARÓ, J.D.R. AND de-FREITAS, L.A.R. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.*, v.92, p.89-94, 2004.

SCHETTINI, D.A.; COSTA VAL, A.P.; SOUZA, L.F.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O.G.F.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; FRÉZARD, F. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36, p.269-272, 2003.

SCHETTINI, D.A.; COSTA VAL, A.P.; SOUZA, L.F.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O.G.F.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; FRÉZARD, F. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 38, p.1879-83, 2005.

SCHETTINI, D.A.; RIBEIRO, R.R.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O.G.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.; FREZARD, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int. J. Pharm.*, v.315, p.140-147, 2006

SCHLEIN Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today.*, v.9 , p. 255-258, 1993.

SECRETARIA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE, <[http:// www.pbh.gov.br/smsa](http://www.pbh.gov.br/smsa)>

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 577-579, 2006.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.P. & BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, p.285-291, 2001.

SLAPPENDEL, R.J.; GRENE, C.E. Leishmaniasis. In: Greene C.E. (Ed). *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: WB Saunders Co. 1990. p.769-777.

SOLANO-GALLEGU, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.560-562, 2001.

SOLANO-GALLEGU, L.; FERNANDEZ-BELLON; H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol.*, v. 130, p.7-12, 2004.

SPRINGER ,T.A. Leucocyte adhesion to cells. *Scand J Immunol.*, v.32, p.211-216, 1990

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol. Cell. Biol.*, v.85, p.138-147, 2007.

SUNDAR, S & RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.15, p.593-598, 2002.

TAFURI, W.L., TAFURI, W.L., BARBOSA, A.J.A., MICHALICK MS, GENARO O, FRANCA-SILVA JC, MAYRINK W, NASCIMENTO E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.38, p.81-89, 1996.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.3, p.203-212, 2001.

TAFURI W.L.; SANTOS R.D.E.L.; ARANTES R.M.; GONCALVES R.; DE MELO M.N.; MICHALICK M.S.; TAFURI W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods.* v.292, p.17-23, 2004.

TALAMAS-ROHANA, P.; WRIGHT, S.D.; LENNARTZ M.R.; RUSSEL, D.G. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leucocyte integrins. *J. Immunol.*, v.144, p.4817-4824, 1990.

TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert. Rev. Diagn.*, v.3, p.657-667, 2003.

TOMÉ, G.S. Contribuição ao estudo da anatomia patológica da leishmaniose visceral canina espontânea, com especial referência ao foco do Ceará. In: CONG. BRAS. HYG. Fortaleza. 1956.p.13.

TRYPHONAS, L.; ZAWDZKA, Z.; BERNARD, M.A.; JANZEN, E.A. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical hematological and pathological observations. *Can. J. Comp. Med.*, v.41, p.1-12, 1977.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8(+) T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. *Parasitol. Int.*, v.54, p.139-46, 2005.

TURK, J.L. & BRYCESON, A.D.M. Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv. Immunol.*, v.13, p.209-266, 1971.

VALLADARES, J.E.; FREIXAS, J.; ALBEROLA, J.; FRANQUELO, C.; CRISTÓFOL, C.; ARBOIX, M. Pharmacokinetics of liposome-encapsulated meglumine antimoniate after intramuscular and subcutaneous administration in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.57, p.403-406, 1997.

VALLADARES, J.E.; RIERA, C.; ALBEROLA, J.; GALLEGU, M.; PORTUS, M.; CRISTOFOL, C.; FRANQUELO, C.; ARBOIX, M.; Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, v.75, p.33-40, 1998.

VALLADARES, J.E.; RIERA, C.; GONZALEZ-ENSENYAT, P.; DIAZ-CASCON, A.; RAMOS, G.; SOLANO-GALLEGU, L.; GALLEGU, M.; PORTUS, M.; ARBOIX, M. ALBERTOLA, J. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using an antimony liposomal formulation. *Vet. Parasitol.*, v.97, p.15-20, 2001.

WILSON, M.E.; PEARSON, R.D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human monocelular phagocytes. *Infect. Immun.*, v.56, p.363-369, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). <<http://www.who.int/leishmaniasis/en>>2004.

WRIGHT, S.D.; CRAIGMYLE, L.S. ; SILVERSTEIN, S.C. Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b and C3bi-mediated phagocytosis in culture human monocytes. *J. Exp. Med.*, v.158, p.1338-1343, 1983.

WRIGHT, S.D.; JONG, M.T. Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, v.164, p.1876-1888, 1986.

WRIGHT, S.D.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J.; RAMOS, R.A. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.*, v.170, p.1231-1241, 1989.

WRIGHT, S.D.; WEITZ, J.I.; HUANG, A.J.; LEVIN, S.M.; SILVERSTEIN, S.C.; LOICKE, J.D. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Immunol.*, v.85, p.7734-7738, 1988

XAVIER, S.C.; DE ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet. Res.*, v.8, p. 2-17, 2006.

YAN, W.; CHEN, W.; HUANG, L. Mechanism of adjuvant activity of cationic liposome: phosphorylation of a MAP kinase, ERK and induction of chemokines. *Mol. Immunol.*, v.44, p.3672-3681, 2007.

9- ANEXOS



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 166/2005**, relativo ao projeto intitulado **"Avaliação anátomo-patológica e aspectos imunológicos de cães naturalmente infectados com leishmania (leishmania) chagasi submetidos a tratamento com derivado de antimônio encapsulado em lipossomas"**, que tem como responsável **Wagner Luiz Tafuri**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **8/03/2006**.

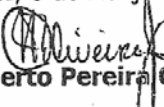
Este certificado expira-se em **8/03/2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 166/2005**, related to the project entitled **"Evaluation anatomopathological and immunological of naturally infected dogs with leishmania (leishmania) chagasi treated with liposome-encapsulated derivated antimoniate"**, under the supervision of **Wagner Luiz Tafuri**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 8, 2006**.

This certificate expires in **March 8, 2011**.

Belo Horizonte, 8 de Março de 2006.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027
www.ufmg.br/prpa/cetea - cetea@prpa.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)