

FRANCINE MARIA DE FRANÇA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PARASITISMO E DO INFILTRADO
INFLAMATÓRIO CUTÂNEO EM CÃES COM INFECÇÃO NATURAL
POR *Leishmania (Leishmania) infantum* (NICOLLE, 1908)**

RECIFE

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCiência ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO PARASITISMO E DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
CUTÂNEO EM CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania)*
infantum (NICOLLE, 1908)**

FRANCINE MARIA DE FRANÇA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2014

Ficha Catalográfica

S586a Silva, Francine Maria de França
Avaliação do parasitismo e do infiltrado inflamatório cutâneo
em cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania)*
infantum (Nicolle, 1908) / Francine Maria de França Silva.
-- Recife, 2014.
62 f.: il.

Orientador (a): Leucio Câmara Alves.
Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biociência
Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife,
2014.

Referências.

1. Leishmaniose 2. Lesão Dermatológica 3. Carga
Parasitária 4. Inflamação 5. Imunidade I. Alves, Leucio
Câmara, orientador II. Título

CDD 591.4

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Avaliação do parasitismo e do infiltrado inflamatório cutâneo em cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Elaborada e defendida por

FRANCINE MARIA DE FRANÇA SILVA

Aprovada em 27 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Dr.^a Elise Miyuki Yamasak
Médica Veterinária Autônoma

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Prof.^a Dr.^a Márcia Paula Oliveira Farias
Médica Veterinária Autônoma

Aos meus queridos e amados pais, Josilda e Luiz de França.

Dedicação e amor sem limites.

AGRADECIMENTOS

O agradecimento é um ato de reconhecimento de que sozinha não conseguiria alcançar os meus objetivos.

A Deus que é a força que me move todos os dias. Amigo fiel e fundamental nos momentos de angústias e incertezas que me fizeram ultrapassar os desafios para chegar ao final de mais uma etapa da minha história. Obrigada pela descoberta da paz interior, pela sabedoria e pelo crescimento pessoal e profissional.

À minha família e em especial aos meus pais, Josilda e Luiz de França, por todo apoio e amor ao longo de toda minha vida. Pela confiança depositada em mim e por acreditarem no meu sonho. Pelas renúncias e abdições em prol da minha educação e da minha felicidade.

A Gleison, meu companheiro de tantos anos, lutas e vitórias. Meu amigo, meu irmão, meu amor. Obrigada por respeitar meus momentos de ausência, pela paciência, carinho e compreensão.

Ao meu amado avó Josué (*in memoriam*), pelo incentivo ao estudo e pelo carinho e apoio dedicados a mim.

À querida tia Jadércia, pelo carinho, estímulo e incentivo.

Ao Prof. Dr. Leucio Alves, pela parceria, confiança e paciência. Muito além da partilha intelectual e profissional, eu levo comigo as lições e orientações de um amigo.

Ao Prof. Dr. Frederico Maia, Fred, por ter sido meu intercessor e por participar e contribuir em mais uma etapa da minha vida. Pelas palavras amigas, apoio e torcida, toda a minha eterna gratidão.

À Prof.^a Dr.^a Mirela Tinucci e à Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, pela parceria profissional e incentivo que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

À querida Andrea Calado, um verdadeiro anjo que Deus colocou na minha vida e que foi essencial para a conclusão desse trabalho, dedicando-se a execução do experimento como se fosse seu. Agradeço também a acolhida fraterna, permitindo-me fazer parte da sua família. Uma providência divina com resultado concreto.

Aos outros anjos, sem os quais não conseguiria essa vitória. Querida Sandra, sempre pronta a ajudar, obrigada pelas palavras amigas e apoio. Edna, Elise e Vinícios, obrigada pela solidariedade e dicas, cada um foi um pedacinho de um quebra-cabeças que se juntaram e deram bons resultados.

Às queridíssimas amigas, Priscilla e Vanessa, pela amizade, pensamentos positivos e infinitas palavras de carinho e apoio, com as quais pude compartilhar minhas alegrias e angústias.

Às amigas e irmãs, Niara e Bruna, que me ajudaram a vencer a saudade de casa e pelo apoio no processo de seleção. A distância física nunca apagará o amor que sinto por vocês. Estarão eternamente no meu coração.

Aos queridos Hévila, Neurisvan, Márcia, Júlio, Glaucia, Luciana, Fernanda, Marília, Nataly, Edson, Nadine e Inês, pelo companheirismo, aprendizado, apoio e palavras de carinho.

Às minhas bichanas, Laila, Clara e Mel (*in memoriam*) e a todos os animais que me ensinam todos os dias o verdadeiro sentido do amor incondicional e infinito. São vocês que dão sentido à minha vida, renovando e aumentando o meu amor e prazer em ser Médica Veterinária.

Tudo posso naquele que me fortalece!

Tudo posso em ti Senhor!

RESUMO

A Leishmaniose Visceral é endêmica no Brasil, podendo acometer algumas espécies de animais, incluindo o cão. Através da picada de vetores flebotomíneos, a *Leishmania infantum* é inoculada na pele, sendo fagocitada por macrófagos e dando início à resposta inflamatória e imunológica. A partir da pele, ela pode se disseminar por outros órgãos, causando sinais clínicos variados e inespecíficos. Contudo, na Leishmaniose Visceral Canina (LVC), as lesões dermatológicas, como alopecia, descamação, dermatite ulcerativa e onicogribose, são as mais frequentemente observadas, justificando o estudo das alterações clínicas e imunológicas da pele que auxiliam na compreensão quanto aos mecanismos de proteção ou susceptibilidade à doença. O objetivo deste estudo foi avaliar o parasitismo e o infiltrado inflamatório na pele de cães com infecção natural por *L. infantum*, utilizando marcadores para linfócitos T, macrófagos e moléculas de MHC II pela técnica de imuno-histoquímica. Fragmentos de pele íntegra (PI) e lesionada (PL) foram coletados de cães com diagnóstico parasitológico e sorológico positivos pela técnica de ELISA e processados para análise do infiltrado inflamatório pela histopatologia e imuno-histoquímica, utilizando o complexo estreptoavidina-peroxidase para avaliação da carga parasitária e quantificação celular, utilizando o anticorpo anti-CD3, anti-macrófago e anti-MHC II. Os resultados da imuno-histoquímica mostraram que a carga parasitária severa predominou em 46,15% (6/13) na PI e 76,92% (10/13) na PL ulcerada, havendo diferença estatística ($p=0,0238$). O infiltrado inflamatório granulomatoso foi observado em 100% (13/13) das amostras de PI e em 76,92% (10/13) na PL, enquanto o piogranulomatoso foi evidenciado em 23,07% (3/10) na PL. Com relação à intensidade do infiltrado inflamatório na PI, observou-se padrão leve em 38,43% (5/13), moderado em 38,43% (5/13) e severo em 23,07% (3/13). Já com relação à PL, o padrão inflamatório severo predominou em 84,61% (11/13), enquanto o moderado foi identificado em apenas 15,38% (2/13), desse modo houve diferença estatística entre a pele PI e PL ($p=0,0017$). A imunomarcagem das moléculas do MHC II foi leve, 38,46% (5/13), moderada 38,46% (5/13) e severa 15,38% (2/13) na PI, enquanto na PL, a marcação foi severa em 76,92% (10/13) e moderada em 23,07% (3/13), havendo também diferença estatística entre a PI e PL (0,0009). A quantificação dos macrófagos ($p=0,0059$) e das células CD3 ($p=0,0425$) também revelou diferença estatística entre a PI e a PL. Em conclusão, a técnica de imuno-histoquímica permitiu a quantificação da carga parasitária, reforçando a importância da pele como reservatório de formas amastigotas de *L. infantum*, com destaque para a pele íntegra que mesmo sem lesão macroscópica pode favorecer a transmissão da doença. A imunomarcagem quantitativa dos linfócitos T (CD3), macrófagos e moléculas de MHC II foi determinada pela severidade da resposta inflamatória desempenhada na pele dos cães infectados, bem como pela carga parasitária, podendo atuar como método auxiliar para a caracterização clínica da leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Leishmaniose. Lesão Dermatológica. Carga Parasitária. Inflamação. Imunidade.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is endemic in Brazil, and occurs in several animal species, including the dog. *Leishmania infantum* is inoculated into the skin during the bite of the phlebotomine vectors, and is then phagocytized by macrophages, which initiates an inflammatory and immunological response. From the skin, it can be disseminated to other organs causing varied and nonspecific clinical signs. In Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), skin lesions such as alopecia, scaling, ulcerative dermatitis, and onychogryphosis are most commonly observed, which justifies the study of the clinical and immunological changes in the skin to help understand the protection or susceptibility mechanisms associated with the disease. The objective of this study was to investigate the parasitism and inflammatory infiltrate in the skin of dogs naturally infected by *L. infantum* using an immunohistochemical technique with markers for T lymphocytes, macrophages, and MHC II. Fragments of intact skin (PI) and damaged skin were collected from dogs with a positive parasitological and serological (ELISA) diagnosis. Histopathological and immunohistochemical analysis of the inflammatory infiltrate was performed, using streptavidin-peroxidase complex to evaluate parasite load, and cell quantification using anti-CD3, anti-macrophage, and anti-MHC II antibodies. Results from the immunohistochemical analysis showed that severe parasite load was predominant in 46.15% (6/13) of PI and 76.92% (10/13) of ulcerated PL, indicating a statistical difference ($p=0.0238$). A granulomatous inflammatory infiltrate was observed in 100% (13/13) of PI and 76.92% (10/13) of PL samples, while a pyogranulomatous infiltrate was found in 23.07% (3/10) of PL. Regarding inflammatory infiltrate, there was a light density in 38.43% (5/13), moderate in 38.43% (5/13), and a high density in 23.07% (3/13) of PI samples. In PL samples, a high density was predominant in 84.61% (11/13), while a moderate density was identified in only 15.38% (2/13), resulting in a statistical difference between PI and PL ($p=0.0017$). Immunostaining of MHC II molecules was minimal 38.46% (5/13), moderate 38.46% (5/13), and severe 15.38% (2/13) in PI, while in PL, staining was severe in 76.92% (10/13) and moderate in 23.07% (3/13) of the samples, also denoting a statistical difference between PI and PL (0.0009). The quantification of macrophages ($p=0.0059$) and CD3 cells (0.0425) also revealed statistically significant differences between PI and PL. In conclusion, immunohistochemistry allowed quantification of the parasite load, underlining the importance of the skin as a reservoir for amastigotes of *L. infantum*, particularly concerning intact skin, which can enable transmission of the disease in the absence of macroscopic lesions. The severity of parasite load and inflammatory response in the skin of infected dogs, which determines the quantitative immunostaining of T lymphocytes (CD3), macrophages, and MHC II molecules, which can act as an auxiliary method for clinical characterization of Canine Visceral Leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis. Skin lesion. Parasite load. Inflammation. Immunity

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo 1	
Figura 1	
Fotomicrografias da pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . A: Derme lesionada com padrão dermatológico ulcerativo em cão com carga parasitária severa. B: Derme lesionada em cão com carga parasitária leve.....	43
Capítulo 2	
Figura A	
<i>Box plot</i> apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo dos escores referentes ao infiltrado inflamatório da pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> , submetida à técnica de imuno-histoquímica.....	51
Figura B	
<i>Box plot</i> apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo da carga parasitária da pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> , submetida à técnica de imuno-histoquímica.....	52
Figura C	
<i>Box plot</i> apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo dos escores referentes à imunomarcação das moléculas de MHC II na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> , submetida à técnica de imuno-histoquímica.....	53
Figura D	
<i>Box plot</i> apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo da imunomarcação dos macrófagos na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> , submetida à técnica de imuno-histoquímica.....	54
Figura E	
<i>Box plot</i> apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo da imunomarcação das células CD3 na pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> , submetida à técnica de imuno-histoquímica.....	55
Figura 1	
Fotomicrografias da pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . A: Infiltrado inflamatório granulomatoso leve na pele íntegra. B: Infiltrado inflamatório focal, perifolicular, perivascular e periglandular na pele íntegra. C: Infiltrado inflamatório severo e difuso na derme de pele lesionada ulcerada. D: Infiltrado inflamatório granulomatoso com presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos na pele lesionada ulcerada.....	59
Figura 2	
Fotomicrografias da pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos à técnica de imuno-histoquímica. A: Discreta imunomarcação	

positiva anti-MHC II na região perifolicular, perivascular e periglandular da derme de pele íntegra. B: Moderada marcação positiva anti-MHC II na derme superficial e região perianexial da pele lesionada ulcerada. C: Discreta imunomarcação positiva anti-macrófago na derme da pele íntegra. D: Intensa marcação positiva anti-macrófago na derme da pele lesionada ulcerada..... 60

Figura 3 Fotomicrografias da pele e linfonodo de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à técnica de imuno-histoquímica. A: Discreta imunomarcação positiva anti-CD3 na derme de pele íntegra. B: Intensa marcação positiva anti-CD3 na derme de pele lesionada ulcerada. C: Infiltrado de células positivas para anti-CD3, perivascular de pele íntegra. D: Controle positivo, mostrando a marcação para anti-CD3 em linfonodo de cão hígido..... 61

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Capítulo 1	
Tabela 1	Avaliação semiquantitativa da carga parasitária da pele íntegra e lesionada de cães com infecção natural por <i>L. infantum</i> através da técnica de imuno-histoquímica.....
	39
Capítulo 2	
Tabela 2	Anticorpos, diluições e recuperação antigênica realizados nos fragmentos de peles de cães com infecção natural por <i>L. infantum</i> através da técnica de imuno-histoquímica.....
	49

SUMÁRIO

	Pág
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL.....	16
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO.....	16
2.3 IMUNOPATOLOGIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	17
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	20
2.5 DIAGNÓSTICO.....	23
REFERÊNCIAS.....	25
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
CAPÍTULO 1: Avaliação do parasitismo cutâneo de cães com infecção por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> (Nicole, 1908) através da técnica de imuno-histoquímica.....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
1 INTRODUÇÃO.....	35
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 ANIMAIS E DIAGNÓSTICO.....	36
2.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

	CAPÍTULO 2: Avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório da pele de cães com infecção natural por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> (Nicole, 1908) utilizando marcadores para linfócitos T (CD3), macrófagos e moléculas de MHCII	44
	RESUMO	45
	ABSTRACT	46
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1	ANIMAIS.....	47
2.2	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA PELE.....	48
2.3	IMUNOMARCAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS T (CD3), MACRÓFAGOS E MOLÉCULAS DE MHC II.....	48
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
5	CONCLUSÕES GERAIS	62

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma importante zoonose que apresenta distribuição mundial e com marcada característica de desenvolvimento crônico da doença (TORRES-NETO et al., 2008). A depender da localização das lesões e comprometimento clínico, elas podem ser classificadas como Leishmaniose Tegumentar, com sintomatologia cutânea, mucocutânea ou em regiões mucosas ou ainda como Leishmaniose Visceral, caracterizada pela presença de lesões sistêmicas, podendo também apresentar lesões dermatológicas (RIBEIRO, 1997; MICHALSKY et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009).

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma parasitose de carácter zoonótico, sendo apontada como uma das doenças mais importantes em cerca de 80 países, sendo um importante problema de saúde pública (ASHFORD; DESJEUX; RAADT, 1992; QUINNELL et al. 2001).

No Brasil a LV é causada pela *Leishmania infantum*, um protozoário intracelular obrigatório que pertence ao complexo *Leishmania donovani* (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010; BANULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007), onde sua transmissão é causada pela picada do inseto *Lutzomyia longipalpis* (DANTAS-TORRES, 2006) e tem como reservatórios canídeos silvestres e domésticos (MOREIRA et al., 2002).

Nas últimas décadas, a LV deixou de ser uma doença apenas de característica e localização rurais, se disseminando para áreas urbanas de médias e grandes cidades. A espécie canina foi inserida nesse novo contexto apresentando um importante papel epidemiológico, atuando como principal fonte de infecção (GONTIGO; MELO, 2004), sendo o reservatório urbano da Leishmaniose Visceral (CIARAMELLA et al., 1997).

A picada da fêmea do flebotomíneo e a inoculação das formas amastigotas na pele, induzem rápida infiltração de neutrófilos e recrutamento de macrófagos (PETERS et al., 2008). A partir daí, o parasito se dissemina para os linfonodos regionais, medula óssea, baço e fígado (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010). Porém, o desenvolvimento da leishmaniose vai depender da habilidade do sistema imune do hospedeiro em responder e controlar a replicação do protozoário, através da qualidade da resposta imune humoral e mediada por células (MORENO; ALVAR, 2002; (SANCHEZ-ROBERT et al., 2005).

No reservatório canino, as lesões dermatológicas são frequentemente observadas de modo localizado, principalmente na face, narinas, região periocular, perilabial e membros ou de modo generalizado. A dermatite descamativa associada à alopecia não pruriginosa e

dermatite ulcerativa indolente, merecem destaque, sendo os padrões mais frequentemente observados (FERRER et al., 1988).

Fatores como, a carga parasitária, a imunidade mediada por células, a resposta humoral e a expressão de citocinas, apresentam um valor preditivo para o progresso da infecção e devem portanto, serem levadas em consideração como marca de resistência e susceptibilidade a LV em cães (REIS et al., 2010).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o parasitismo e o infiltrado inflamatório na pele de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum*, utilizando marcadores para linfócitos T, macrófagos e moléculas de MHC II pela técnica de imuno-histoquímica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada um grave problema de Saúde Pública e está disseminada por todo mundo, sendo considerada endêmica em regiões como na Bacia Mediterrânea na Europa, Ásia e África, (CARRILHO; MORENO, 2009), além do continente Americano, especialmente o Brasil (DANTAS-TORRES, 2009; MAIA-ELKHOORY et al., 2008).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

A LV é causada por um protozoário intracelular que pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ASHFORD, 2000; GRAMICCIA, 2011), no qual agrupam-se cerca de 30 espécies, sendo 21 delas consideradas como patogênicas (ASHFORD, 2000).

Nos países do chamado novo mundo, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) era há algumas décadas conhecida como *Leishmania chagasi* e nos países do velho mundo, a Leishmaniose Visceral é atribuída a *Leishmania infantum*. Contudo, pesquisas demonstraram que bioquimicamente e geneticamente tratam-se da mesma espécie, havendo a distinção apenas quanto à nomenclatura (MAURICIO et al., 2001). Deste modo, além do Brasil, a *L. infantum* encontra-se disseminada em países no sudeste da Europa, norte da África, oeste e Ásia central e em outros países das Américas (WHO, 2010; SOLANO-GALLEGU et al., 2011; GRAMICCIA et al., 2011).

Morfologicamente, a *Leishmania* caracteriza-se por apresentar o Kinetoplasto que armazena o material genético, DNA mitocondrial. Pode apresentar duas formas distintas, conhecidas como promastigota e amastigota. A forma promastigota, é dotada de um flagelo e apresenta grande capacidade de movimentação, estando localizada no trato intestinal dos vetores flebotomos. Já a forma amastigota, apresentar-se arredondada ou oval. Ela está localizada dentro do fagolisossomo das células do sistema monocítico fagocitário no hospedeiro vertebrado (GRAMICCIA et al., 2011).

No Brasil, os vetores biológicos da LV são flebotomíneos, cuja principal espécie é o *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; RANGEL, 2005), além de *Lu. migonei* no estado de

Pernambuco (CARVALHO et al., 2010), o *Lu. cruzi* nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (PITA-PEREIRA et al., 2008; MISSAWA et al., 2011).

O principal modo de transmissão da LV ocorre por meio da picada das fêmeas dos vetores flebotomíneos no momento do repasto sanguíneo, no qual a forma promastigota infectante que está presente nos mosquitos vetores é introduzida na pele dos hospedeiros vertebrados. Após ser fagocitada pelas células do sistema monocítico-fagocitário e penetrar nas células, a *L. infantum* perde o flagelo e adquire a forma amastigota (SOLLANO-GALEGO et al., 2011).

O cão doméstico tem sido considerado o principal reservatório da LV em ambiente urbano. Consequentemente, a infecção pela *L. infantum* nos cães pode variar de assintomática à doença clínica grave e fatal, dificultando a determinação da condição imunológica dos cães ao longo do curso da infecção, assim como, o diagnóstico da LV (CARRILHO; MORENO, 2009).

Apesar da transmissão pelo vetor, outras formas de transmissão com menor importância epidemiológica, como a transmissão via transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001) e venérea (SILVA et al., 2009), já foram relatadas em cães.

2.3 IMUNOPATOLOGIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença imunomediada, devido à capacidade do parasito em interagir com o sistema imune do indivíduo infectado (BANETH et al., 2008). Neste contexto, a pele, local onde ocorre a infecção pela *L. infantum*, representa o primeiro elo de interação entre o parasito e o hospedeiro, atuando como fonte das formas infectantes do parasito, para que ocorra a transmissão ao vetor flebotomíneo (SARIDOMICHELAKI et al., 2007).

L. infantum pode infectar diferentes tipos de células, incluindo as células do sistema monocítico fagocitário, como os macrófagos, além de outros tipos celulares como as células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos, células endoteliais e hepatócitos. Contudo, os macrófagos são considerados o principal tipo de célula hospedeira deste patógeno (KONTOS; KOUTRINAS, 1993).

Após ser fagocitado, principalmente por macrófagos, ocorre a disseminação por meio da circulação sanguínea e linfática, sendo encontrada parasitando macrófagos residentes em diferentes órgãos (REIS et al., 2006).

Os cães infectados pela *L. infantum* podem desenvolver imunidade celular protetora, mediada por linfócitos T e não apresentar sinais clínicos, permanecendo como reservatórios (SACCHI et al., 2006). Contudo, outros cães podem desenvolver a forma clínica, sintomática, sendo considerados do ponto de vista imunológico como susceptíveis, sendo observado nesses animais, decréscimo da resposta imune celular e marcada resposta imune humoral e normalmente apresentam altos títulos de imunoglobulinas nos testes sorológicos (ABRANCHES et al., 1991; PINELLI et al., 1994; MARTINEZ-MORENO et al., 1995; BARBIERI, 2006; REIS et al., 2006a).

A disseminação do parasito ocorre de acordo com o status imunológico do hospedeiro (VERAS et al., 2010). Nos cães susceptíveis, o parasito pode se disseminar rapidamente, já nos pacientes resistentes à infecção, a *L. infantum* pode permanecer localizada na pele ou nos linfonodos regionais (SARIDOMICHELAKIS et al., 2009).

Os baixos níveis de linfócitos T-helper do tipo CD4 e CD8, além das células B, como CD21 e monócitos CD14 nas células mononucleares de sangue periférico, estão associados com a alta densidade parasitária na medula óssea de cães com LV (REIS et al., 2006b).

Células T CD4 de cães sintomáticos respondem a estimulação antigênica durante o estágio precoce da infecção, mas perde esta habilidade com a progressão da doença disseminada clinicamente (BOGGIATTO et al., 2010). Em contraste, altos níveis de células T citotóxicas CD8, apresentadas no sangue periférico de cães assintomáticos, foram associadas ao controle do parasita *Leishmania*, uma vez que essas células atuam induzindo a lise celular (REIS et al., 2006).

A compreensão do perfil de quimiocinas durante a infecção da *L. infantum* em cães, constitui uma etapa preliminar para a identificação dos mecanismos de resistência ou susceptibilidade (MENEZES-SOUZA et al., 2011). Desse modo, os mecanismos imunológicos de resistência à LVC estão associados aos linfócitos T do tipo T-helper 1 (Th1) que produzem citocinas como, IFN- γ , IL-2 e TNF- α (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995).

Os macrófagos são células importantes na resposta imune contra *L. infantum*. Atuam principalmente como células apresentadoras de antígenos através das moléculas de MHC,

assim como, desempenham o papel de células hospedeiras na multiplicação do parasito, através da fagocitose, além da produção de citocinas moduladoras da resposta mediada pelos linfócitos T. Estas células medeiam a ativação de células Th1 que agem sobre os macrófagos infectados como efetores para a morte intracelular do parasito (ZER et al., 2001).

Os macrófagos ativados pelas citocinas INF- γ e TNF- α , promovem a destruição intracelular do parasito, principalmente por meio da via de l-arginina e produção de óxido nítrico (HOLZMULLER et al., 2006), sendo este o principal mecanismo desempenhado pelos macrófagos para a eliminação do parasito (PINELLI et al., 2000). Falhas na produção de óxido nítrico, a partir da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) pelos macrófagos, favorecem a multiplicação e proliferação da *L. infantum*, agravando a doença (ZAFRA et al., 2008).

A detecção de intenso parasitismo na pele de animais sem a presença de lesões, ou seja, uma pele aparentemente saudável, reforça a participação de um perfil de citocinas associadas com a resistência ou susceptibilidade à infecção da *Leishmania sp.* Dentre elas, podem ser citadas a IL-12 que apresenta como função a indução da produção de IFN- γ pelas células mononucleares de sangue periférico e pelas células Natural Killer (NK). Além disso, a IL-12 atua no desenvolvimento da imunidade específica mediada por células T do tipo 1 (TRINCHIERI et al., 2003).

Por outro lado os linfócitos T do tipo T-helper 2 (Th2), produzem e ativam citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, que normalmente favorecem a produção de anticorpos e estão associadas à susceptibilidade para o desenvolvimento da doença (MESQUITA JUNIOR et al., 2010).

Os cães com intenso parasitismo cutâneo exibem padrão imunoregulatório, predominantemente representado pela expressão de IL-10 e TGF- β , em comparação aos animais com parasitismo médio ou baixo, ou ainda nos cães que não apresentam a doença (MENEZES-SOUZA et al., 2011). Dessa forma, o incremento na expressão da IL-10 e do TGF- β , pode permitir a manutenção da multiplicação do parasita, e portanto, o estado da doença clínica (MENEZES-SOUZA et al., 2011).

Níveis elevados de IL-5 na pele de cães assintomáticos infectados pela *L. infantum*, foram observados por Menezes-Souza et al. (2011), estando envolvida no controle da infecção por promover a diferenciação e ativação de eosinófilos e ao aumento da geração e

ativação de linfócitos T citotóxicos específicos (NAGASAWA; OHSHIBA; YATA, 1991; MARY et al., 1999; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2005).

Do mesmo modo, na avaliação da resposta imune local da pele, é possível observar as citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e Th2 e o aumento na expressão de citocinas da cascata Th2, como a IL-4, estando associada com a severidade dos sinais clínicos e a alta carga parasitária nas lesões dermatológicas (BRACHELENTE et al., 2005).

Para que ocorra a ativação das células T, é necessário um sinal primário emitido pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC), presente na superfície das células apresentadoras de antígeno, bem como um sinal gerado pelas moléculas co-estimulatórias (DIAZ et al., 2012). O MHC é uma região que pode auxiliar no controle da susceptibilidade à LVC, particularmente algumas classes, como o alelo 67 DLA-DRB1, o alelo 18 DLA-DQA 1, além do alelo 47 DLA-DQB 1 (KENNEDY et al. 2001, 2002a, 2002b).

Quinnell et al. (2003), demonstraram associação significativa entre a presença do alelo DLADRB1* 01502 e susceptibilidade à LVC, apresentando níveis mais altos de IgG e maior possibilidade de resultados positivos pela técnica de PCR em amostras de medula óssea.

Na dermatite esfoliativa, as células epidérmicas que expressam MHC II são constituídas principalmente pelos queratinócitos e células de Langherans, enquanto observa-se menor presença de linfócitos CD4, quando comparado à pele sem lesão macroscópica, nos cães sintomáticos (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005).

Mesmo diante desses mecanismos desempenhados, o resultado da infecção pela *L.infantum* é secundário ao balanço entre a habilidade do hospedeiro em induzir mecanismos para o controle do parasito, bem como pelas estratégias desempenhadas pelo parasito para suprimir ou escapar da resposta imune do hospedeiro (BUATES; MATLASHEWSKI, 2001).

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A LVC é uma doença sistêmica que pode acometer diferentes compartimentos orgânicos e teciduais, com presença de variados e inespecíficos sinais clínicos (SOLANO- GALEGO et al., 2011). Os cães podem exibir sinais discretos a moderados ou ainda apresentar-se aparentemente saudáveis, sem sintomatologia clínica evidente, conhecidos como assintomáticos (MANCIANTI; MECIANI, 1988).

A forma assintomática representa 20-40% da população sorologicamente positiva, das quais 80% desenvolvem a doença clínica (NOLI, 1999). Nas áreas urbanas da região nordeste do Brasil, a forma assintomática representa 30% da população positiva nos testes sorológicos (QUEIROZ et al., 2009). Os animais assintomáticos, porém sorologicamente positivos, representam fases da doença, antes da progressão crônica ou formas resistentes que podem ter resolução espontânea. Esses animais podem ter a capacidade de causar a doença, assim como, os animais com sintomatologia clínica (GRAMICCIA, 2011).

Os sinais clínicos mais comumente observados nos cães com LVC são, a linfadenopatia, emagrecimento progressivo, ceratoconjutivite, hepatoesplenomegalia, diarreia, dermatopatias, dentre outros. Em estágios mais avançados, observa-se também paresia dos membros posteriores, caquexia e inanição, evoluindo para a morte (FEITOSA et al., 2000; BRASIL, 2004; ALBUQUERQUE et al., 2007).

Alguns cães com LV podem ainda, apresentar doença renal como única manifestação clínica. A doença pode iniciar como um quadro de glomerulopatia e proteinúria leves ou de modo mais grave, pode evoluir para um quadro de Síndrome Nefrótica ou Insuficiência Renal em fase terminal, sendo esta, uma das principais causas de óbitos nos animais acometidos (SOLANO-GALEGO et al., 2011).

As dermatopatias são muito comuns e estão presentes em aproximadamente 80 a 90% dos casos de LVC (SLAPPENDEL, 1988; KOUTINAS et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001), sendo muitas vezes o único sinal clínico observado (KOUTINAS et al., 1993). Os sinais dermatológicos mais frequentes incluem, alopecia, pelos opacos, descamação, onicogribose, hiperqueratose, prurido, além de lesões ulcerativas e crostosas na orelha, focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia localizada ou multifocal (FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997).

Ferrer et al. (1988), descreveram quatro padrões dermatológico para cães com LV. O padrão alopécico-descamativo é considerado o mais comum, seguido pelo padrão ulcerativo e menos frequentemente, os padrões nodular e pustular estéril.

A dermatite esfoliativa com formação de caspas branco-acinzentadas é um achado comum na LV em cães. A esfoliação pode ser generalizada, mas geralmente é mais pronunciada na cabeça, orelhas e extremidades, podendo estar associada às áreas simétricas de hipotricose e alopecia (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; TORRES-NETO et al., 2008). A hiperqueratose nasodigital pode acompanhar a formação de caspas e a pele envolvida

também pode apresentar padrão variando de hipotricose a alopecia (SCOTT; MILLER; GRIFFIN 2001).

A dermatite ulcerativa é representada pela presença de úlceras cutâneas, podendo ser circunscritas, anulares ou policíclicas, com bordas elevadas e fundo granuloso de cor vermelho-vivo, recobertas ou não por exsudato seroso e serosanguinolento (TORRES-NETO et al., 2008). Elas podem ser mais comumente localizadas nas margens das orelhas, narinas, além de pontos de pressão, como nas patas e junções mucocutâneas, associadas aos locais com constante traumatismo e dano vascular (CIARAMELLA et al., 1997; FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997; KOUTINAS et al., 1999; CIARAMELLA; CORONA, 2003).

A dermatite nodular é menos frequente podendo acometer além da pele, região de mucosa como a língua. Este padrão pode variar de pápulas a nódulos tumorais isolados (FERRER et al., 1988; FERRER et al., 1990).

Segundo Ordeix et al. (2005), a presença de pápulas como apresentação única, caracterizam o padrão dermatológico como papular, devendo ser diferenciado do padrão nodular, não sendo dessa forma considerados como o mesmo padrão dermatológico.

As pápulas podem estar presentes no abdômen ventral, na região periocular e perilabial, além das narinas, face interna do pavilhão auricular e em região de mucosa como, na língua. Apresentam baixo parasitismo intralesional, sendo considerada uma forma benigna de apresentação clínica da LVC. Por isso, a presença de pápulas sem a existência de alterações clínicas sistêmicas, resulta em um prognóstico favorável, já que está associado à imunocompetência no hospedeiro, (ORDEIX et al. 2005).

O padrão pustular estéril é considerado o mais atípico, com baixa carga parasitária intralesional (FERRER et al., 1988). As alterações histopatológicas revelam foliculite supurativa associada ou não à dermatite pustular intraepitelial (KOUTINAS et al. 1993).

Estudos imuno-histoquímicos da resposta imune na pele de cães naturalmente infectados pela *L. infantum*, quantificaram os parasitas e os componentes celulares presentes (células de Langerhans, queratinócitos expressando MHCII, macrófagos e linfócitos T), correlacionando-os com características dermatológicas e aspectos observados nos animais estudados como, alopecia, lesões nodulares não ulceradas, dermatoses ulceradas e descamação. Os resultados sugeriram que a dermatite alopécica desenvolve controle mais

efetivo da infecção, enquanto os cães com dermatite nodular generalizada apresentam menor resposta imune contra o parasita (FONDEVILA; VILAFRANCA; FERRER, 1997).

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico preciso da LVC baseado nas características clínicas do paciente e em resultados de exames laboratoriais como, hemograma, urinálise e perfil bioquímico, torna-se complexo e difícil, já que gera resultados não específicos e amplos. Para o diagnóstico preciso, faz-se necessária a aplicação de métodos parasitológicos diretos e métodos indiretos, utilizando testes sorológicos e imunológicos (GRAMICCIA et al., 2011).

O exame parasitológico é considerado um dos testes de diagnóstico mais importantes para LVC, por possibilitar a visibilização do parasita em amostras de diferentes tecidos como pele, aspirado de linfonodo e medula óssea, biopsia de fígado e baço, analisados de modo direto por microscopia ou por cultura celular (ALVAR et al., 2004; FERREIRA et al., 2012). Porém, nos casos de baixa carga parasitária, a sensibilidade deste teste diminui consideravelmente (REIS et al., 2006a).

A histopatologia pode ser utilizada no diagnóstico parasitológico da LVC, além também de possibilitar a avaliação tecidual e dos constituintes celulares presentes no tecido. Diante disso, a característica histopatológica mais frequentemente observada na LVC, é a presença de reação inflamatória granulomatosa com presença de formas amastigotas dentro dos macrófagos (BANETH et al., 2008), associada à presença de linfócitos e plasmócitos (COSTA et al., 2008; CALABRESE et al., 2010).

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) permite a localização de antígenos nos tecidos, em suspensões de células ou esfregaços. Esta técnica promove a imunomarcagem por meio da ligação entre o antígeno e o seu respectivo anticorpo, podendo ser visibilizada no tecido em estudo (SOUZA, 2010), além de permitir a avaliação da carga parasitária em diferentes tecidos como, linfonodo, pele, fígado e baço (COSTA et al., 2008; TASCA et al., 2009). Este método de diagnóstico é complementar ao exame histopatológico com coloração em HE, principalmente quando o parasito não está claramente identificável, além de ter a vantagem de não necessitar de amostras complementares e permitir a identificação do parasito tanto na pele lesionada, quanto na pele clinicamente saudável (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005; QUEIROZ et al., 2010).

O diagnóstico da LVC pode ser feito ainda de modo presuntivo, pela detecção de anticorpos IgG, utilizando técnicas sorológicas quantitativas, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), teste imunoenzimático (ELISA) e a técnica de imunocromatografia (SANTOS et al., 2008; SOLANO-GALLEGO, 2011; GRAMICCIA, 2011).

Pesquisa recente estudou o teste rápido Dual-Path Platform (DPP®), como novo método de diagnóstico da LVC (GRIMALDI et al., 2012). Este teste é um ensaio imunocromatográfico que apresenta como vantagens, a simplicidade e a facilidade na sua utilização, além da rapidez na obtenção dos resultados, apresentando para cães sem sinais clínicos evidentes da doença, especificidade maior (96%), em relação à sensibilidade (47%) (GRIMALDI et al., 2012).

Métodos moleculares como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) apresentam alta sensibilidade e são utilizados com frequência, a partir de amostras de tecidos congelados, fixados em formaldeído ou já emblocados em parafina (GRAMICCIA, 2011).

A PCR em tempo real, qPCR, também se configura como um importante teste de diagnóstico, apresentando sensibilidade maior em relação à técnica convencional (FRANCINO et al., 2006). Possibilita a avaliação quantitativa da carga parasitária, podendo ser utilizada no acompanhamento da evolução da doença ou para avaliar a eficácia dos protocolos de tratamento nos cães acometidos pela LVC (REIS et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 537-550, 1991.
- ALBUQUERQUE, A. L. et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clinica Veterinária**, v. 71, p. 78-80, 2007.
- ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, p. 275-283, 2010.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88, 2004.
- ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; RAADT, P. Estimation of risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 5, p. 104-105, 1992.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 324-330, 2008.
- BANULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, p. 100-109, 2007.
- BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 329-337, 2006.
- BOGGIATTO, P. M. et al. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 17, p. 267-273, 2010.
- BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 166-175, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica sobre vacina antileishmaniose visceral canina**. Brasília, 2004.
- BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 3416-3422, 2001.
- CALABRESE, K. S. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 253-257, 2010.

- CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 67-70, 2009.
- CARVALHO, M. R. et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 116, p.108-110, 2010.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.
- CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, p. 358-368, 2003.
- COSTA, M. M. S. et al. Cervical, mandibular, and parotid lymph Nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 613-616, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista Saúde Pública**, v. 40, p. 537-541, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasite & Vectors**, v. 2, suppl 1, 2009.
- DIAZ, S. et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 137-144, 2012.
- FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – SP (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 5, p. 36-44, 2000.
- FERREIRA, S. A. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-9, 2012.
- FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988.
- FERRER, L. et al. Atypical nodular leishmaniasis in two dogs. **Veterinary Record**, v. 126, p. 90, 1990.
- FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 319-327, 1997.
- FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 214-221, 2006.

GOMES, A. A. D. **Avaliação imunoistoquímica da musculatura estriada esquelética em cães com leishmaniose visceral**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 23-30, 2011.

GRIMALDI JR, G. et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54-59, 2012.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J. L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, v. 132, p. 19-32, 2006.

KENNEDY, L. J. et al. Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 2000: Second report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. **Tissue Antigens**, v. 58, p. 55-70, 2001.

KENNEDY, L. J. et al. Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. **Tissue Antigens**, v. 59, p. 194-204, 2002a.

KENNEDY, L. J. et al. Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations. **Tissue Antigens**, v. 60, p. 43-52, 2002b.

KONTOS, V. J.; KOUTINAS, A. F. Old World canine leishmaniasis. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 33, p. 949-960, 1993.

KOUTINAS, A. F. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kalazar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. **Veterinary Dermatology**, v. 3, p. 121-130, 1993.

KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis (CVL) in Greece: a retrospective study of 158 spontaneous cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, p. 376-83, 1999.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 811-827, 2005.

MAIA-ELKHOURY, A. N. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2941-2947, 2008.

MANCIANTI, F.; MECIANI, N.; Specific sero-diagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 1409-1411, 1988.

MARTÍNEZ-MORENO, A. et al. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 209-220, 1995.

MARY, C. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8⁺ and gamma interferon and interleukin-5-production CD4⁺ antigen-specific T-cells. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5559-5566, 1999.

MAURICIO, I. L. et al. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v. 122, p. 393-403, 2001.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 39-49, 2011.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 552-580, 2010.

MICHALSKY, E. M. et al. Infectivity os seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 67-76, 2007.

MISSAWA, N. A. et al. Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 76-78, 2011.

MOREIRA, M. A. B. et al. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 103-106, 2002.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v.18, p. 399-405, 2002.

NAGASAWA, M.; OHSHIBA, A.; YATA, J. Effect of recombinant interleukin 5 on the generation of cytotoxic T cells (CTL). **Cellular Immunology**, v. 133, p. 317-326, 1991.

NOLI, C. Canine leishmaniosis. **Waltham Focus**, v. 9, p. 16-24, 1999.

OLIVEIRA, E. F. et al. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, p. 277-284, 2013.

ORDEIX, L. et al. Papular dermatitis due to *Leishmania spp.* infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 187-191, 2005.

OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 1076-1083, 2001.

PAPADOGIANNAKIS, E. I. et al. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 227-237, 2005.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, p. 487-495, 2005.

PETERS, N. C. et al. GERMAIN, R.N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970-974, 2008.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum* specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex restricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 1594-1600, 1995.

PINELLI, E. et al. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 181-189, 2000.

PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, p. 66-69, 2008.

QUEIROZ, P. V. et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 267-273, 2009.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 32-38, 2010.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1421-1424, 2001.

QUINNELL, R. J. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, p. 22-28, 2003.

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

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 146, p. 303-311, 2006b.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 87-95, 2009.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 341-349, 2010.

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 3, p. 13-14, 1997.

SACCHI, L. et al. The intradermal leishmanin reaction induces antigen-specific maturation of canine dendritic cells with up-regulation of MHC II synthesis and expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 17-24, 2006.

SANCHEZ-ROBERT, E. et al. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case control study. **Journal of Heredity**, v. 96, p. 755-758, 2005.

SANTOS, L. R. et al. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, p. 43-48, 2004.

SANTOS, W. L. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 251-259, 2008.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, v. 18, p. 227-233, 2007.

SCOTT, D. W.; MILLER, D. H.; GRIFFIN, C. E. **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders. 2001, 1528p.

SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 55-59, 2009.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 423-431, 2009.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v. 10, p. 1-16, 1988.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*- specific IGG, IGG1 and IGG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 265-276, 2001.

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

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, 2011.

SOUZA, S. M. **Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório cardíaco durante a fase aguda da infecção experimental de cães por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanossoma cruzi***. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

TASCA, K. I. et al. Exames parasitológicos, imunoistoquímicos e histopatológicos para detecção de *Leishmania chagasi* em tecidos esplênicos de cães com leishmaniose visceral. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 27-33, 2009.

TORRES-NETO, R. et al. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. **Semina Ciências Agrárias**, v. 29, p. 667-676, 2008.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v. 19, p. 641-644, 2003.

VERAS, P. S. T. et al. Primary immune response and parasite dissemination in canine visceral leishmaniasis. **Animal Biology Journal**, v. 1, p. 205-221, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the Leishmaniases**. 2010. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2014.

ZAFRA, R. et al. High INOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 353-359, 2008.

ZER, R. et al. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 810-814, 2001.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o parasitismo e o infiltrado inflamatório na pele de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum*, utilizando marcadores para linfócitos T, macrófagos e moléculas de MHC II pela técnica de imuno-histoquímica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a marcação com anticorpo policlonal anti-CD3 na pele de cães com infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum*;
- Realizar a marcação com anticorpo monoclonal anti-macrófago em cães com infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum*;
- Realizar a marcação com anticorpo monoclonal anti-MHC II na pele de cães com infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum*;
- Correlacionar a imunomarcação das células CD3, macrófago e MHCII com o infiltrado inflamatório na pele dos cães infectados;
- Realizar o diagnóstico parasitológico de LVC através da técnica de imuno-histoquímica;
- Avaliar o parasitismo cutâneo de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum*;
- Correlacionar a carga parasitária na pele íntegra e lesionada, em cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum*.
- Avaliar os padrões dermatológicos dos cães com LV.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DO PARASITISMO CUTÂNEO DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) infantum* (NICOLLE, 1908) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Avaliação do parasitismo cutâneo de cães com infecção natural por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908) através da técnica de imuno-histoquímica

Evaluation of cutaneous parasitism in dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908) using the immunohistochemical technique

SILVA, F.M.F¹; SANTOS, E.M.S¹; TORRES, S.M¹; YAMASAK, E.M¹; ALVES, L.C¹.

1- Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil, CEP: 52171-900.

RESUMO

A pele é o local de inoculação da *Leishmania infantum* nos hospedeiros susceptíveis e dessa forma, as dermatopatias são os principais sinais clínicos observados, com destaque para a dermatite ulcerativa. Entretanto, os cães assintomáticos também apresentam importante papel na transmissão e epidemiologia da Leishmaniose Visceral. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o parasitismo na pele íntegra e lesionada ulcerada em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, através da técnica de imuno-histoquímica. Fragmentos de pele íntegra e lesionada foram coletados de 13 cães com diagnóstico parasitológico positivo e diagnóstico sorológico pela técnica de ELISA, sendo processados para imuno-histoquímica pelo complexo estreptoavidina-peroxidase. As lesões ulcerativas foram observadas em cotovelo 53,84% (7/13), narina 15,38% (2/13), orelha 23,07% (3/13) e sobre a asa do ílio 7,69% (1/13). Os resultados da imuno-histoquímica mostraram que a carga parasitária severa predominou em 46,15% na pele íntegra e 76,92% na pele lesionada ulcerada nos cães avaliados. Contudo, houve diferença estatística e a carga parasitária severa na pele ulcerada foi estatisticamente superior à pele íntegra ($p=0,0238$). A técnica de imuno-histoquímica permitiu a quantificação da carga parasitária, reforçando a importância da pele como reservatório de formas amastigotas de *L. infantum*, com destaque para a pele íntegra que mesmo sem lesão macroscópica pode favorecer a transmissão da doença.

Palavras-chave: Pele. Leishmaniose. Imuno-histoquímica. Reservatório. Cão

ABSTRACT

Leishmania infantum is inoculated into the skin of susceptible hosts and, as such, skin conditions are the main clinical sign, particularly ulcerative dermatitis. However, asymptomatic dogs also have an important role in the transmission and epidemiology of Visceral Leishmaniasis. Therefore, the present objective was to study the parasitism in intact and ulcerated skin in dogs naturally infected with *L. infantum*, using immunohistochemistry. Fragments of intact and damaged skin were collected from 13 dogs with a parasitological and serological (ELISA) diagnosis and submitted for immunohistochemical analysis using streptavidin-peroxidase complex. Ulcerative lesions were observed in the elbow 53.84% (7/13), nostril 15.38% (2/13), ear 23.07% (3/13), and over the wings of the ilium 7.69% (1/13). Results of the immunohistochemistry analysis showed that severe parasite load was predominant in 46.15% of intact skin and 76.92% of ulcerated skin in these dogs. Statistical difference was observed, with severe parasite load in the ulcerated skin higher than in the intact skin ($p=0.0238$). Immunohistochemistry allowed quantification of the parasite load, underlining the importance of the skin as a reservoir for amastigotes of *L. infantum*, especially regarding intact skin, which can enable transmission of the disease in the absence of macroscopic lesions.

Keywords: Skin. Leishmaniasis. Immunohistochemistry. Reservoir. Dog.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a Leishmaniose Visceral (LV) pode acometer várias espécies de animais, com destaque para a espécie canina, considerada o principal reservatório da *Leishmania infantum* em ambiente urbano (GRAMICCIA, 2011).

Os cães infectados por *L. infantum*, podem desenvolver uma doença grave, com comprometimento sistêmico e sinais clínicos variados como, linfadenopatia, perda de peso severa, lesões oftalmológicas, distúrbios circulatórios, doença renal crônica, além das dermatopatias (CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005; LIMA; PEIRO; VASCONCELOS, 2007).

As principais alterações cutâneas na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) incluem, alopecia, onicogrifose, descamação (REIS et al., 2006; QUEIROZ et al., 2010), além de lesões ulcerativas, hiperqueratose, hipotricose e crostas localizadas ou generalizadas

(TORRES-NETO et al., 2008a; QUEIROZ et al., 2010). Estes sinais dermatológicos são por vezes os únicos sinais clínicos presentes nos animais acometidos (KOUTINAS et al., 1993).

Padrões dermatológicos na LVC foram caracterizados por Ferrer et al. (1988), sendo o descamativo e o ulcerativo aqueles mais comumente observados, além do padrão nodular e pustular estéril.

Diante disso, as lesões ulcerativas cutâneas podem estar dispostas na narina, lábio, face, periocular, orelhas e sobre as áreas de projeções ósseas, principalmente nas regiões úmero-radio-ulnar, calcâneo e tuberosidade isquiática (CAMINHA; SOTO-BLANCO, 2008; TORRES-NETO et al., 2008a).

Desse modo, a pele constitui uma excelente opção de diagnóstico quer seja pelo encontro de formas amastigotas de *L. infantum* através de exames parasitológicos, como a citologia esfoliativa, ou pela imunomarcacão (TAFURI et al., 2004; QUEIROZ et al., 2011), bem como pela detecção de DNA do parasito (QUEIROZ et al., 2011; REIS et al., 2013).

Nesse contexto, a avaliação da carga parasitária na pele de cães sintomáticos e assintomáticos, pode auxiliar na compreensão quanto ao parasitismo e potencial de transmissão aos hospedeiros susceptíveis (SOLLANO-GALEGO et al., 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o parasitismo na pele íntegra e lesionada de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* através da técnica de imunohistoquímica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E DIAGNÓSTICO

Para a realização do experimento foram utilizados 13 cães com idade, raça e sexo variados, provenientes dos Centros de Vigilância Ambiental dos municípios de Petrolina (9°23'39"S, 40°30'35"O) e Goiana (7°34'19"S, 35°0'7"O) no Estado de Pernambuco. Para execução do experimento, todos os procedimentos invasivos foram realizados mediante aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, segundo licença 010/2011.

Os cães foram submetidos ao exame clínico para a investigação de sinais sugestivos de Leishmaniose Visceral (LV), destacando-se os sinais clínicos dermatológicos de acordo com

Ferrer et al. (1988), dando-se preferência ao padrão ulcerativo e a avaliação quanto à localização das úlceras cutâneas.

O diagnóstico da LVC foi realizado através do teste sorológico de imunoadsorção enzimática (ELISA) e pelo método parasitológico direto, por meio da citologia esfoliativa da pele lesionada e biopsia de medula óssea na crista do osso esterno ou na asa do ílio.

A partir da confirmação positiva para LVC, pelos exames parasitológicos, procedeu-se a realização da biopsia de pele, na qual foram coletados fragmentos de pele íntegra, preferencialmente na região da escápula, porém quando esta região apresentava algum tipo de lesão dermatológica, a biopsia foi realizada na região abdominal. Quanto à pele lesionada, a biopsia foi realizada nas locais com presença de úlceras cutâneas. Os fragmentos foram coletados, utilizando um *punch* de quatro milímetros (mm), sendo em seguida acondicionados em frascos individuais contendo solução de formol tamponado 10% por 48 horas para fixação e posteriormente acondicionados em solução de álcool etílico 70%.

2.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica, foi realizada pela estreptoavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas da *L. infantum*, segundo Tafuri et al. (2004). Como anticorpo primário foi utilizado o soro de cão hiperimune na diluição de 1:100. Após a incubação overnight em câmara úmida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado (LSAB - Dako Cytomation K0675, Carpinteria, USA) à temperatura ambiente e posteriormente procedeu-se a incubação com complexo estreptoavidina-peroxidase (LSAB-DakoCytomation, K0675, Carpinteria, USA). A reação foi revelada utilizando-se solução de diaminobenzina (DAB, Sigma, St Louis, USA) e contracoloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Para finalizar, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, clarificados e montados com lamínula e Ethelan.

Para o controle da reação de imuno-histoquímica, amostras da pele de cão com intenso parasitismo foram utilizadas como controle positivo e negativo, sendo que neste último caso, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

As imunomarcações foram analisadas de forma semiquantitativa por microscopia óptica e o parasitismo foi avaliado como o número de amastigotas imunomarcadas e expresso como um número médio de amastigotas observadas em cinco campos no aumento de 400X. A carga

parasitária foi definida da seguinte forma: (-) ausente; (+) leve; (++) moderada e (+++) severa, correspondendo a 0, 1-100, 101-300 e > 300 amastigotas, respectivamente, de acordo com o protocolo estabelecido por Giunchetti et al. (2006).

Para verificar se houve significância da diferença entre a carga parasitária nos fragmentos de pele íntegra e pele lesionada foi aplicado o teste de Mann-Whitney, Software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), considerando estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cães apresentaram padrões dermatológicos variados, com predominância do alopécico-descamativo e ulcerativo. As lesões ulcerativas foram observadas em cotovelo 53,84% (7/13), narina 15,38% (2/13), orelha 23,07% (3/13) e sobre a asa do ílio 7,69% (1/13).

A presença de úlceras cutâneas é um sinal clínico muito frequente na LVC (GIUNCHETTI et al., 2006), ocorrendo segundo Costa et al., (2008) em 45% dos cães acometidos.

A presença de lesões ulcerativas nos cotovelos observadas, assemelham-se às descritas por Ferrer et al. (1988), que relataram a presença de dermatite ulcerativa e afirmaram que esta normalmente encontra-se associada aos locais de projeções ósseas.

Neste estudo, todos os fragmentos de pele submetidos à técnica de imuno-histoquímica apresentaram imunorreatividade, tanto nas amostras de pele lesionada, quanto nas amostras de pele íntegra.

De acordo com Ordeix et al. (2005), a técnica de imuno-histoquímica possibilita alto grau de contraste entre as formas amastigotas da *L. infantum* e o tecido do hospedeiro, o que permite um diagnóstico mais preciso, corroborando com as observações de Tafuri et al. (2004) e Figueiredo (2010).

Conforme apresentado na Tabela 1, quanto à avaliação da carga parasitária, o parasitismo severo (Figura 1), foi evidenciado em 46,15% dos animais com pele íntegra e 76,92% dos cães com pele lesionada ulcerada.

Tabela 1: Avaliação semiquantitativa da carga parasitária da pele íntegra e lesionada de cães com infecção natural por *L. infantum* através da técnica de imuno-histoquímica.

Tecido Cutâneo	Carga Parasitária		
	Leve	Moderada	Severa
Pele íntegra	4/13 (30,76%)	3/13 (23,07%)	6/13 (46,15%)
Pele lesionada	2/13 (15,38%)	1/13 (7,69%)	10/13 (76,92%)

A análise estatística evidenciou diferença significativa entre os animais com pele íntegra e pele lesionada com $p=0,0238$. Portanto, a pele lesionada apresentou carga parasitária estatisticamente superior à pele íntegra. Estes resultados divergem dos observados por Papadogiannakis et al. (2005), que não observaram diferença entre a carga parasitária na pele íntegra e lesionada.

No que concerne à carga parasitária leve na pele íntegra (30,76%) aqui observada, é provável que uma resposta imune inicial exerça um papel importante na LVC, assemelhando-se ao que relataram Calabresse et al. (2010) ; Menezes-Souza et al. (2011) e Veras et al., (2010), destacando a participação de macrófagos, além de IL-4 , TNF- α e IFN- γ no controle parasitário.

Vale a pena ressaltar que 46,15% (6/13) dos fragmentos da pele íntegra aqui examinados, apresentaram carga parasitária severa, o que provavelmente ocorreu, devido à falha na resposta imune celular local da pele que não desempenhou um controle eficiente na replicação da *Leishmania sp*, conforme relatado por Calabresse et al. (2010) e Menezes-Souza et al. (2011). Esta alta carga parasitária observada, relaciona-se a fase crônica de desenvolvimento da doença nos pacientes acometidos, confirma citado por Reis et al. (2006).

A presença da carga parasitária moderada e severa nas amostras de pele íntegra, auxiliam na comprovação que a pele mesmo ausente de lesões macroscópicas, pode albergar um grande número de parasitas e atuar como fonte de transmissão aos vetores flebotomíneos, conforme citado por Tafuri et al. (2004) e Laurenti et al. (2013).

Ainda com relação à pele íntegra, um grande número de formas amastigotas do parasito, podem estar localizados, principalmente ao redor do folículo piloso e do plexo vascular na derme. Isto ajuda a comprovar que a disseminação pode ocorrer por via

sanguínea, existindo um tropismo da *L. infantum* pelo tecido cutâneo, conforme citação de Sollano-Galego et al. (2004).

No que diz respeito à carga parasitária e ao encontro de formas amastigotas de *L. infantum* nas lesões cutâneas ulcerativas neste estudo, elas foram facilmente visibilizadas em todas as avaliações semiquantitativas do parasitismo, divergindo de Torres-Neto et al. (2008b), que não observaram *L. infantum* em animais com dermatopatia ulcerativa.

Ainda referente ao padrão dermatológico ulcerativo, houve predominância da carga parasitária severa, em relação ao parasitismo moderado e leve, resultados semelhantes foram obtidos por Giunchetti et al., (2006), avaliando cães sintomáticos e assintomáticos infectados pela *L. infantum*. Contudo, a relação entre a carga parasitária e a severidade das lesões cutâneas observadas macroscopicamente não foi evidenciada por Saridomichelakis et al. (2007), o que diverge dos nossos resultados.

4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que a técnica de imuno-histoquímica permitiu a quantificação da carga parasitária, reforçando a importância da pele como reservatório de formas amastigotas de *L. infantum*, com destaque para a pele íntegra que mesmo sem lesão macroscópica pode favorecer a transmissão da doença.

REFERÊNCIAS

- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0-Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém**. Brasília: CNPq, 2007, 290 p.
- CALABRESE, K. S. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 253-257, 2010.
- CAMINHA, A. E. Q.; SOTO-BLANCO, B. Clinical features of canine visceral leishmaniasis at Fortaleza city, Ceará, Brazil. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina na cidade de Fortaleza, CE. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p. 218-222, 2008.
- CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 67-75, 2005.
- COSTA, M. M. S. et al. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 613-616, 2008.
- FIGUEIREDO, M. M. et al. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Histology and Histopathology**, v. 25, p. 877-887, 2010.
- FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988.
- GIUNCHETTI, R. C. et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 100-107, 2006.
- GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 23-30, 2011.
- KOUTINAS, A. F. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kalazar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. **Veterinary Dermatology**, v. 3, p. 121-130, 1993.
- LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 296-300, 2013.
- LIMA, V. M. F.; PEIRO, J. R.; VASCONCELOS, R. O. IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. **Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 189-193, 2007.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **Neglected Tropical Disease**, v. 6, p. 1-11, 2012.

ORDEIX, L. et al. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 187-191, 2005.

PAPADOGIANNAKIS, E. I. et al. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 227-237, 2005.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 32-38, 2010.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 1-8, 2011.

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

REIS, L. E. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 498-503, 2013.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, v. 18, p. 227-233, 2007.

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

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, p. 17-23, 2004.

TORRES-NETO, R. et al. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. **Semina Ciências Agrárias**, v. 29, p. 667-676, 2008a.

TORRES-NETO, R. et al. Imunomarcagem de células CD3 e CD79a nas lesões descamativas e ulcerativas de cães com leishmaniose. **Semina Ciências Agrárias**, v. 29, p. 165-174, 2008b.

VERAS, P. S. T. et al. Primary immune response and parasite dissemination in canine visceral leishmaniasis. **Animal Biology Journal**, v. 1, p. 205-221, 2010.

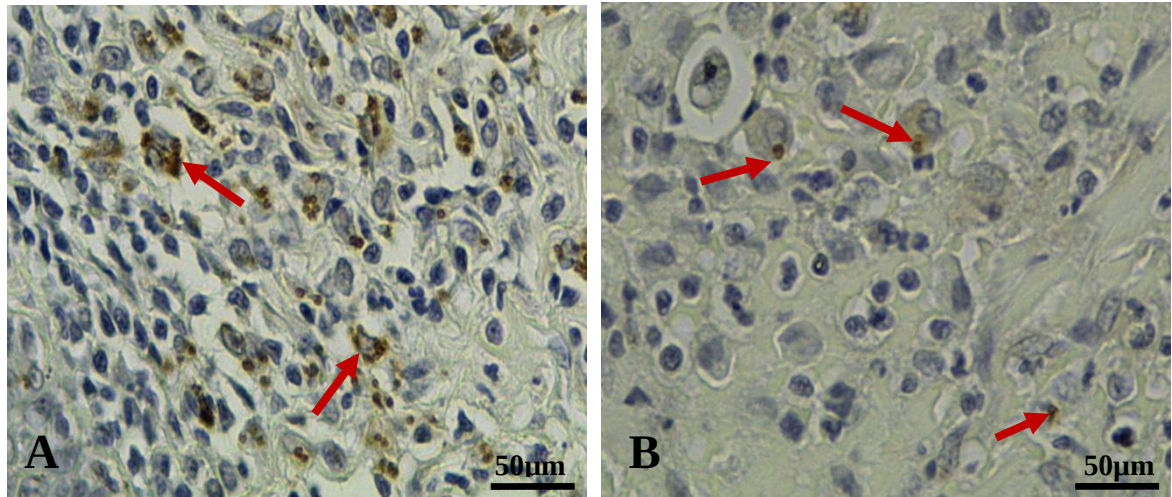


Figura 1: Fotomicrografias da pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Figura 1A: Derme lesionada com padrão dermatológico ulcerativo em cão com carga parasitária severa, submetido à técnica da imuno-histoquímica pela estreptoavidina-peroxidase. Presença de inúmeras formas amastigotas intracitoplasmáticas. Macrófagos repletos de formas amastigotas de *L. infantum* reveladas pela IHQ. Seta vermelha. LSAB. DAB. 50µm.

Figura 1B: Derme lesionada em cão com carga parasitária leve, submetido à técnica da imuno-histoquímica pela estreptoavidina-peroxidase. Presença de raras formas amastigotas de *L. infantum*. Seta vermelha. LSAB. DAB. 50µm.

CAPÍTULO 2

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DA PELE DE
CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) infantum*
(NICOLE, 1908) UTILIZANDO MARCADORES PARA LINFÓCITOS T,
MACRÓFAGOS E MOLÉCULAS DE MHC II**

Avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório da pele de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicole, 1908) utilizando marcadores para linfócitos T, macrófagos e moléculas de MHC II

Quantitative evaluation of the inflammatory infiltrate in the skin of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicole, 1908) using markers for lymphocytes T, macrophages, and MHC II molecules

SILVA, F.M.F¹.; CALADO, A.M.C².; YAMASAK, E.M¹.; TORRES, S.M¹.; SANTOS, E.M.S¹.; TINUCCI-COSTA, M².; ALVES, L.C¹

1- Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Avenida Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil, CEP: 52171-900.

2- Universidade Estadual Paulista-UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal-SP, Brasil, CEP 14884-900.

RESUMO

A *Leishmania infantum* multiplica-se inicialmente na pele, onde as células do infiltrado inflamatório, como macrófagos, linfócitos e plasmócitos são requeridas e atuam desempenhando uma resposta imunoregulatória, resultando no surgimento dos sinais clínicos, principalmente as lesões dermatológicas. O objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório na pele de cães com infecção natural por *L. infantum*, utilizando marcadores para linfócitos T, macrófagos e moléculas de MHC II pela técnica de imuno-histoquímica. Fragmentos de pele íntegra (PI) e lesionada (PL) foram coletados de cães com diagnóstico parasitológico e sorológico positivos e processados para histopatologia e imuno-histoquímica, utilizando o complexo estreptoavidina-peroxidase para avaliação da carga parasitária e quantificação celular, utilizando o anticorpo anti-CD3, anti-macrófago e anti-MHC II. O infiltrado inflamatório granulomatoso foi observado em 100% (13/13) das amostras de PI e em 76,92% (10/13) na PL, enquanto o piogranulomatoso foi evidenciado em 23,07% (3/10) na PL. Com relação à intensidade do infiltrado inflamatório na PI, observou-se padrão leve em 38,43% (5/13), moderado em 38,43% (5/13) e severo em 23,07% (3/13). Já com relação a PL, o padrão inflamatório severo predominou em 84,61% (11/13), enquanto o moderado foi identificado em apenas 15,38% (2/13), havendo desse modo diferença estatística entre os grupos ($p=0,0017$). Também houve diferença estatística ($p=0,0238$) com relação à carga parasitária, sendo evidenciado parasitismo severo em 46,15% (6/13) na PI, enquanto que na PL foi de 76,92% (10/13). Com relação a imunomarcagem das moléculas do MHC II, foi observado padrão leve em 38,46% (5/13), moderada em 38,46% (5/13) e severa em 15,38% (2/13) na PI, enquanto na PL, a marcação foi severa em 76,92% (10/13) e moderada em 23,07% (3/13), também sendo observada diferença estatística entre os grupos

($p=0,0009$). A quantificação dos macrófagos ($p=0,0059$) e das células CD3 ($p=0,0425$) também revelou diferença estatística entre a PI e PL. Em conclusão, a imunomarcagem quantitativa dos linfócitos T (CD3), macrófagos e moléculas de MHC II foi determinada pela severidade da resposta inflamatória desempenhada na pele dos cães infectados, bem como pela carga parasitária, podendo atuar como método auxiliar para a caracterização clínica da Leishmaniose Visceral Canina.

Palavras-Chave: Leishmaniose. Inflamação. Parasitismo. Imuno-histoquímica

ABSTRACT

Leishmania infantum initially multiplies in the skin, where cells from the inflammatory infiltrate, such as macrophages, lymphocytes, and plasmocytes, are required and perform an immunoregulatory response, which leads to the clinical signs, especially skin lesions. The objective of this study was to perform a quantitative evaluation of the inflammatory infiltrate in the skin of dogs naturally infected with *L. infantum* using immunohistochemical analysis with markers for T lymphocytes, macrophages, and MHC II molecules. Fragments of intact and damaged skin were collected from dogs with a positive parasitological and serological diagnosis and submitted for histopathological and immunohistochemical analysis using streptavidin-peroxidase complex to evaluate parasite load and cell quantification using anti-CD3, anti-macrophage, and anti-MHC II antibodies. A granulomatous inflammatory infiltrate was observed in 100% (13/13) of PI and 76.92% (10/13) of PL samples, while a pyogranulomatous infiltrate was found in 23.07% (3/10) of PL. Regarding inflammatory infiltrate, there was light density in 38.43% (5/13), moderate in 38.43% (5/13), and a high density in 23.07% (3/13) of PI samples. In PL samples, a high density was predominant in 84.61% (11/13), while a moderate density was identified in only 15.38% (2/13), resulting in a statistical difference between groups ($p=0.0017$). There was also a statistical difference ($p=0.0238$) regarding parasite load, where severe parasite density was predominant in 46.15% (6/13) of PI and 76.92% (10/13) of ulcerated PL. Immunostaining of MHC II molecules was minimal 38.46% (5/13), moderate 38.46% (5/13), and severe 15.38% (2/13) in PI, while in PL, staining was severe in 76.92% (10/13) and moderate in 23.07% (3/13), also indicating a statistical difference between PI and PL (0.0009). The quantification of macrophages ($p=0,0059$) and CD3 cells (0,0425) also revealed statistically significant differences between PI and PL. In conclusion, the severity of parasite load and inflammatory response in the skin of infected dogs, which determines the quantitative immunostaining of T lymphocytes (CD3), macrophages, and MHC II molecules, which can act as an auxiliary method for clinical characterization of Canine Visceral Leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis. Inflammation. Parasitism. Immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

A pele dos cães desempenha importante papel na infecção por *Leishmania infantum*. Sendo assim, o parasitismo cutâneo e a severidade das lesões cutâneas, estão diretamente associadas à resposta imune do animal, não ocorrendo a mesma intensidade durante a evolução da doença (SANTOS, BADARÓ, FREITAS, 2004; BRACHELENTE et al., 2005; GIUNCHETTI et al., 2006).

Entre as lesões dermatológicas, com maior frequência destacam-se aquelas alopecicas e descamativas, caracterizando a dermatite esfoliativa, seguida da dermatite ulcerativa. Menos frequentemente observadas, encontram-se a dermatite nodular e pustular (FERRER et al., 1988; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005).

As alterações estruturais observadas na pele de cães infectados por *L. infantum*, variam de infiltrado inflamatório local ou difuso na derme, com presença de formas amastigotas dentro dos macrófagos, linfócitos e plasmócitos (SANTOS; BADARÓ; FREITAS, 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; BANETH et al., 2008), e neutrófilos, caracterizando o processo piogranulomatoso (BANETH et al., 2008).

O estudo da resposta imune na pele de cães infectados por *L. infantum* e sua associação com níveis distintos de parasitismo tecidual e a progressão clínica da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), podem auxiliar na busca de novas descobertas com consequente elucidação quanto aos mecanismos de progressão e proteção durante a infecção (KEMP; THEANDER; KHARAZMI, 1996; REIS et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente o infiltrado inflamatório na pele de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*, utilizando marcadores para linfócitos T, macrófagos e moléculas de MHC II pela técnica de imuno-histoquímica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Para a realização do experimento foram utilizados 13 cães com idade, raça e sexo variados, provenientes dos Centros de Vigilância Ambiental dos municípios de Petrolina (9°23'39"S, 40°30'35"O) e Goiana (7°34'19"S, 35°0'7"O) no estado de Pernambuco. Para execução do experimento, todos os procedimentos invasivos foram realizados mediante

aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, segundo licença 010/2011.

O diagnóstico da LVC foi realizado pelo método parasitológico direto por meio da citologia esfoliativa da pele lesionada e biopsia de medula óssea, bem como pelo teste sorológico de imunoadsorção enzimática (ELISA).

2.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA PELE

Os fragmentos de pele íntegra e lesionada, preferencialmente na região da escápula e de pele lesionada com padrão dermatológico ulcerativo, foram coletados com auxílio de *punch* quatro milímetros (mm), sendo em seguida acondicionadas em frascos individuais contendo solução de formol tamponado 10% por 48 horas para fixação e posteriormente acondicionados em solução de álcool etílico 70%. Posteriormente estas amostras foram submetidas à desidratação, clarificação e incluídas em parafina. Cortes de cinco micrômetros (µm) foram realizados em micrótomo e posteriormente coradas com Hematoxilina-Eosina (HE).

A avaliação do infiltrado inflamatório quanto ao padrão e população de células, foi realizado segundo Solano-Gallego et al. (2004), a saber: (-) ausência de infiltrado inflamatório, (+) presença de focos isolados de células inflamatórias; (++) presença de focos agregados de infiltrado inflamatório; (+++), áreas difusas de infiltrado inflamatório. As cruzes foram substituídas pelos seguintes escores: 0, 1, 2 e 3 respectivamente.

2.3 IMUNOMARCAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS T (CD3), MACRÓFAGOS E MOLÉCULAS DE MHC II

A imunomarcção foi realizada utilizando o complexo estreptoavidina-peroxidase (Labelled-Streptavidina-Biotina-LSAB) para detecção de formas amastigotas da *Leishmania infantum*, segundo Tafuri et al. (2004), bem como para a imunomarcção celular de linfócitos T (CD3), macrófagos e moléculas de MHC II.

Os anticorpos utilizados na imuno-histoquímica, bem como as diluições e os tratamentos térmicos para a recuperação antigênica, encontram-se listados na Tabela 1.

Após o resfriamento, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena, utilizando-se peróxido de hidrogênio 3% diluído em metanol para os anticorpos anti-CD3 e anti-MHC II. Já para o anticorpo anti-macrófago, utilizou-se o peróxido de hidrogênio a 8% também diluído em metanol.

Tabela 2: Anticorpos, diluição e recuperação antigênica realizados nos fragmentos de peles de cães naturalmente infectados pela *L. infantum* através da técnica de imuno-histoquímica.

Anticorpo	Diluição	Recuperação Antigênica
Anti-CD3 Policlonal (A0452)	1:100 (BSA 1%)	Microondas, três ciclos de cinco minutos em solução citrato (ph 6,0).
Anti-macrófago MAC 387 (M0747)	1:100 (Diluyente de anticorpo-Dako, S3022, CA, USA)	Panela de pressão tipo Pascal (Dako, USA), durante 5 minutos após atingir a pressão em solução citrato (ph 6,0).
Anti-MHC II TAL 1B5 (M0746)	1:200 (Diluyente de anticorpo-Dako, S3022, CA, USA).	Steamer Cuis (Biocare Medical, DC 2002) 97°C por 30 minutos, em solução citrato (ph 6,0).

O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com *Bacground Sniper* (BS966L) para o anticorpo anti-macrófago e para os demais anticorpos, utilizou-se o leite em pó desnatado a 6%. Os cortes foram incubados em câmara úmida 4°C, *over night* e posteriormente foram lavados em solução salina tamponada (PBS). Como sistema de detecção, utilizou-se o polímero marcado Envision (Kit Envision + Dual Link System, K4061, Dako, CA, USA), para o anticorpo anti-MHC II. Com relação aos demais anticorpos, foi utilizado o Kit LSAB (KO690, Dako, CA, USA). A visualização da reação foi realizada utilizando a solução de 3,3 diaminobenzina (DAB) (Dako, K3468) e na sequência os cortes foram submetidos à contracoloração com Hematoxilina de Harris.

Amostras de pele de cães hígidos foram utilizadas como controles positivos e negativos para os anticorpos anti-macrófago e anti-MHC II, sendo os controles negativos tratados com Universal Negative Control Mouse (Biocare Medical, NC494H). Já para o anticorpo anti-CD3, foram utilizados cortes de linfonodos tratados com PBS.

A avaliação quanto à reatividade do MHC II foi realizada por microscopia, considerando-se a sua presença e distribuição no corte, seguindo o escore: (0), ausente; (1) escasso - imunomarcações isoladas e aleatoriamente distribuídas; (2), moderado - imunomarcações em grupos com distribuição multifocal e (3), acentuado - imunomarcações difusas por todo o corte, segundo o descrito por Beretta (2011).

A contagem da marcação dos macrófagos e linfócitos T foi realizada por morfometria, contando-se cinco campos aleatórios no aumento de 400X.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, através do software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), considerando estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. A confecção dos gráficos *Box plot*, foi realizada através do software Medcalc.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

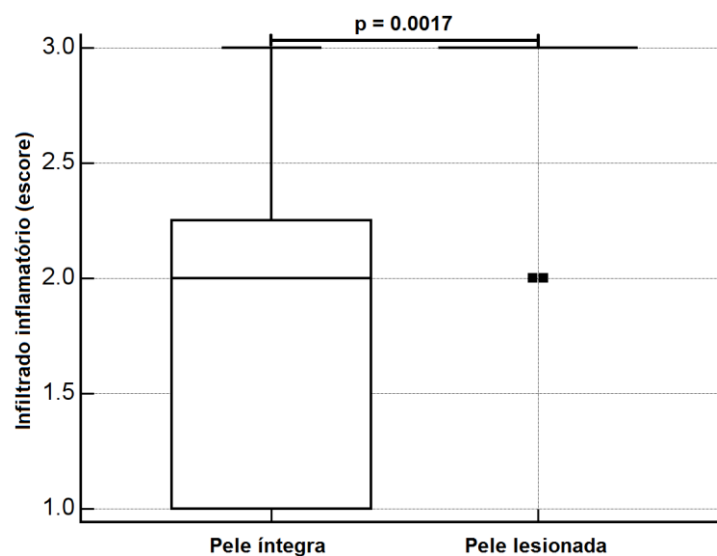
Nos animais avaliados quanto ao infiltrado inflamatório, foi possível identificar que na pele íntegra, 100% (13/13) das amostras apresentaram infiltrado inflamatório granulomatoso com presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (Figura 1A e 1B), enquanto que na pele lesionada, o infiltrado inflamatório granulomatoso foi observado em 76,92% (10/13) e o piogranulomatoso em 23,07% (3/10), caracterizado pela presença de neutrófilos, além de macrófagos, linfócitos e plasmócitos.

Os resultados aqui observados, são concordantes com aqueles relatados por Abranches et al. (1991); Solano-Gallego et al. (2001); Solano-Gallego et al. (2004) e Baneth et al. (2008) que observaram reação inflamatória, caracterizada pela presença de um exsudato celular composto por macrófagos repletos de formas amastigostas, plasmócitos e linfócitos, tanto na pele lesionada como na íntegra, independente dos sinais clínicos presentes em animais com LVC.

Na pele íntegra, houve predominância do padrão inflamatório leve em 38,43% (5/13) e moderado 38,43% (5/13), enquanto apenas 23,07% (3/13) dos cães, apresentaram padrão severo.

Já com relação à pele lesionada, o padrão inflamatório severo predominou em 84,61% (11/13) dos animais (Figura 1C e 1D), enquanto o moderado foi identificado em apenas 15,38% (2/13) dos cães estudados, sendo observada diferença estatística entre a pele íntegra e lesionada (Figura A).

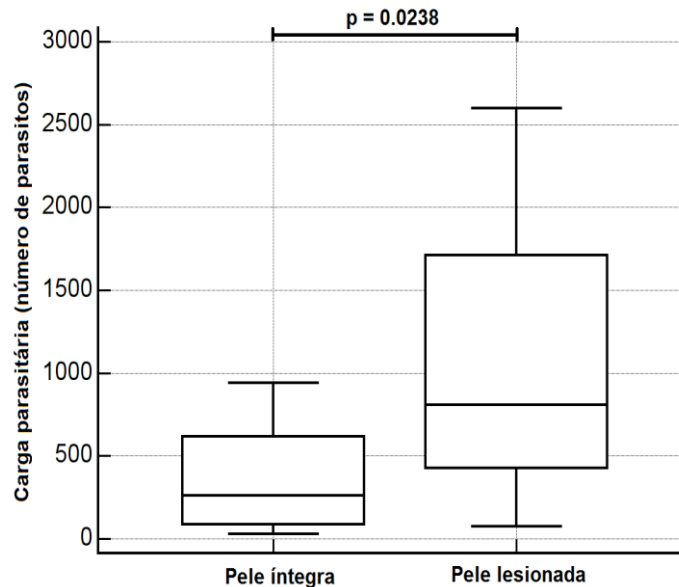
Figura A: *Box plot* apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo dos escores referentes ao infiltrado inflamatório da pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, submetida à técnica de imuno-histoquímica. Considerando-se $p \leq 0,05$.



Tanto na pele íntegra quanto na pele lesionada, no padrão inflamatório leve foi possível identificar células difusas ao longo da derme superficial em pequena quantidade e mais frequentemente, distribuídas de modo localizado formando agregados (Figura 1B). No padrão moderado e severo, principalmente na pele lesionada, o infiltrado inflamatório apresentou distribuição difusa e uniforme, apresentando maior intensidade nas regiões perifoliculares, perivasculares e periglandulares (Figura 1C). Resultados semelhantes foram obtidos por Solano-Gallego et al. (2004); Costa et al. (2008) e Figueiredo et al. (2010).

Com relação à avaliação da carga parasitária, o parasitismo severo foi predominante, tanto na pele íntegra como na pele lesionada. Na pele íntegra dos cães avaliados, a carga parasitária severa foi evidenciada em 46,15% (6/13), enquanto que na pele lesionada foi de 76,92% (10/13), havendo diferença estatística entre os grupos avaliados (Figura B).

Figura B: *Box plot* apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo da carga parasitária da pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, submetida à técnica de imuno-histoquímica. Considerando-se $p \leq 0,05$.



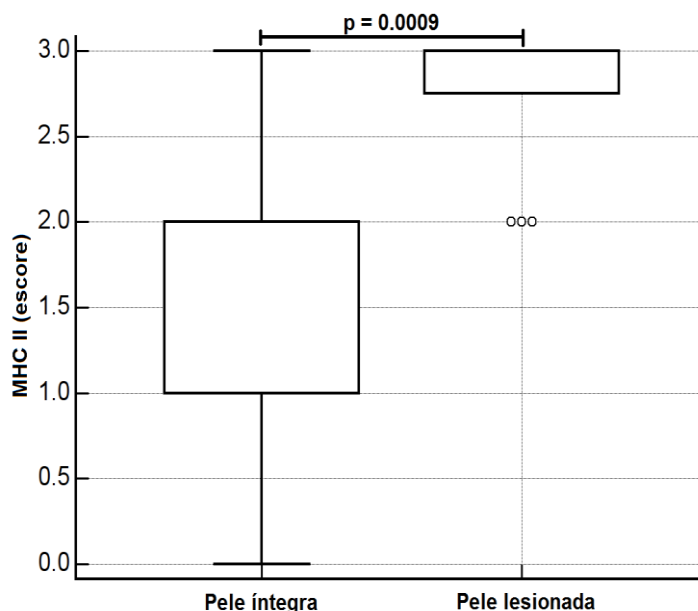
Vale salientar que neste estudo, foi observada a presença de infiltrado inflamatório difuso e intenso na pele de cães com alta carga parasitária. Resultados semelhantes foram obtidos por Santos, Badaró, Freitas (2004) e Giunchetti et al. (2006). Isto reforça a ideia, de que quanto maior o parasitismo desempenhado pela *L. infantum*, maior será a resposta inflamatória desenvolvida, como descrito por Solano-Galego et al. (2004).

Ainda com relação à carga parasitária, Santos, Badaró, Freitas (2004), não evidenciaram a presença da *L. infantum* nas áreas com distribuição de infiltrado inflamatório localizado, discordando dos resultados aqui obtidos, uma vez que foi possível identificar as formas amastigotas do parasito, tanto distribuídas de modo difuso ao longo da derme, quanto em áreas isoladas do infiltrado inflamatório.

Com relação à imunomarcagem das moléculas do MHC II, apenas um animal com pele íntegra não obteve marcação, enquanto os demais apresentaram marcação leve 38,46% (5/13) (Figura 2A) e moderada 38,46% (5/13) e apenas 15,38% (2/13) dos cães apresentaram marcação severa.

No que diz respeito à pele lesionada, a imunomarcação do MHC II nos cães foi predominantemente severa 76,92% (10/13), enquanto que 23,07% (3/13) apresentaram marcação moderada. (Figura 2B). Dessa forma, houve diferença estatística entre a pele íntegra e lesionada (Figura C).

Figura C: *Box plot* apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo dos escores referentes à imunomarcação das moléculas de MHC II na pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, submetida à técnica de imuno-histoquímica. Considerando-se $p \leq 0,05$.



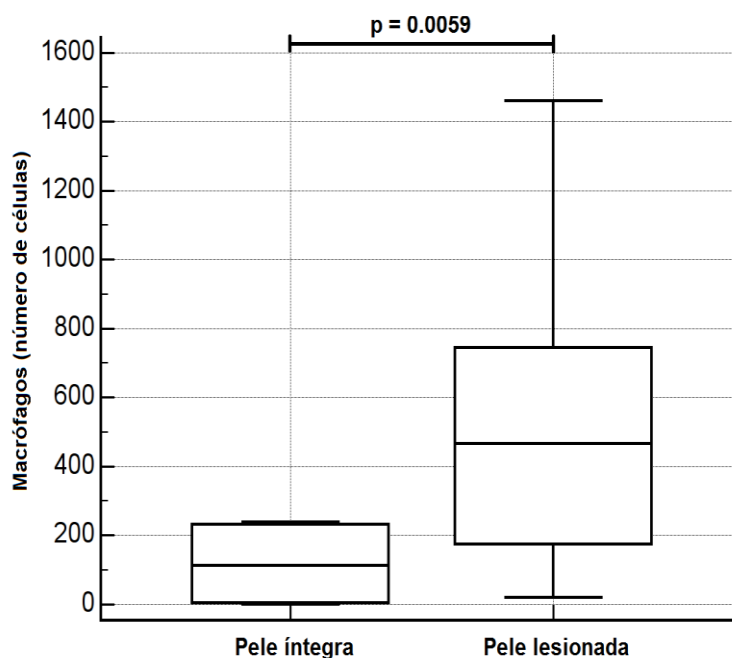
A expressão das moléculas de MHC II aqui observada, ocorreu de modo diferente, apresentando maior intensidade na pele lesionada. Segundo Papadogiannakis et al. (2005), isso pode ser justificado, devido à alteração do perfil de citocinas que surgem de acordo com o infiltrado inflamatório presente.

A pele lesionada apresentou uma maior expressão das moléculas de MHC II, bem como maior severidade quanto ao infiltrado inflamatório. A intensa resposta inflamatória, neste caso, promoveu maior ativação celular mediada pelo MHC II. Porém, a presença da carga parasitária severa, sugere alteração quanto à resposta imune celular desempenhada no controle do parasito, como citado por Menezes-Souza et al. (2012).

No que concerne à imunomarcação dos macrófagos, apenas um cão não apresentou marcação na pele íntegra e outro animal não apresentou marcação na pele lesionada.

De modo geral, a marcação dos macrófagos ocorreu preferencialmente ao longo da derme superficial e menos intensamente na derme profunda (Figura 2C e 2D). Sendo possível, evidenciar diferença estatística entre a pele lesionada e a pele íntegra (Figura D).

Figura D: *Box plot* apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo da imunomarcação dos macrófagos na pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, submetida à técnica de imuno-histoquímica. Considerando-se $p \leq 0,05$.

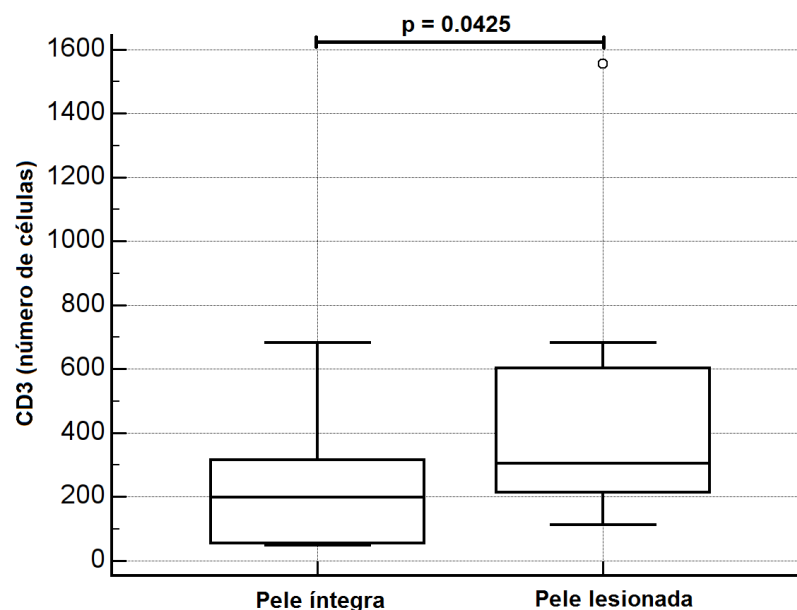


Foi possível observar que os fragmentos de pele lesionada dos cães aqui examinados, apresentaram infiltrado inflamatório com maior quantificação de macrófagos associado à alta carga parasitária, concordando com as observações de Santos, Badaró, Freitas (2004) e Reis et al. (2009), os quais observaram parasitismo na pele dos animais infectados pela *L. infantum* normalmente associado ao processo inflamatório, sendo possível encontrar infiltrados de macrófagos normalmente associados à carga parasitária severa, com presença de infiltrado inflamatório localizado ou generalizado.

Vale salientar, que a determinação da carga parasitária ocorre não somente pela presença dos macrófagos no foco da infecção, mas sim devido à qualidade da atividade leishmanicida desempenhada pelos macrófagos que podem atuar apenas como células transportadoras do parasito sem promover a sua eliminação (SARIDOMICHELAKIS et al. 2007).

O padrão de marcação das células CD3 pela imuno-histoquímica, ocorreu tanto de modo difuso e mais intenso, principalmente na pele lesionada (Figura 3B), quanto de modo focalizado, principalmente nas áreas com maior presença de infiltrado inflamatório (Figura 3C). A imunomarcagem das células CD3 foi quantitativamente superior na pele lesionada em relação à pele íntegra, revelando diferença estatística (Figura E).

Figura E: *Box plot* apresentando a mediana, percentis, valor máximo e mínimo da imunomarcagem das células CD3 na pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, submetida à técnica de imuno-histoquímica. Considerando-se $p \leq 0,05$.



A intensa ativação das células CD3 aqui observada, tanto na pele íntegra como na pele lesionada, reforçam que a participação dessas células é importante na resposta inflamatória desencadeada pela *L. infantum*, assim como os macrófagos, sendo ativadas devido à interação com as moléculas do MHC II e de citocinas produzidas, conforme descrito por Antoine et al. (1991).

Neste estudo desenvolvido, a intensidade da imunomarcção das moléculas de MHC II, bem como dos macrófagos e células CD3 na pele, ocorreu juntamente com a intensidade da reação inflamatória crônica, tanto na pele íntegra quanto na pele lesionada, corroborando com a descrição de Santos, Badaró, Freitas (2004) e Giunchetti et al. (2006). Esta maior quantificação celular pode ainda ser justificada, devido à presença da carga parasitária severa, o que consequentemente leva ao maior afluxo de células inflamatórias, como descrito por Coura-Vital et al. (2011).

Entretanto, estes resultados divergem dos observados por Saridomichelakis et al. (2007), que não obtiveram correlação positiva entre a densidade parasitária e severidade das lesões macroscópicas e do infiltrado inflamatório.

Na pele íntegra dos animais que apresentaram infiltrado inflamatório leve, houve menor intensidade da marcação do MHC II, bem como reduzido número de células marcadas pelo CD3 e uma menor quantidade de macrófagos. Esta ausência de lesões macroscópicas pode estar relacionada à imunocompetência apresentada pelo hospedeiro ou devido à fase inicial de desenvolvimento da doença, associado à recente inoculação do parasito, já que não foi possível observar a presença de lesões macroscópicas cutâneas, mesmo diante da presença e multiplicação do parasito na pele, como relatado por Solano-Gallego et al. (2004).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a imunomarcção quantitativa dos linfócitos T (CD3), macrófagos e moléculas de MHC II foi determinada pela severidade da resposta inflamatória desempenhada na pele dos cães infectados, bem como pela carga parasitária, podendo atuar como método auxiliar para a caracterização clínica da Leishmaniose Visceral Canina.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 537-550, 1991.
- ANTOINE, J. C. et al. Localization of major histocompatibility complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 764-775, 1991.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0-Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém**. Brasília: CNPq, 2007, 290 p.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 324-330, 2008.
- BERETTA, D. C. **Lesões do músculo gastrocnêmio e da junção músculo tendínea em cães afetados pela distrofia muscular progressiva**. 2011. 51 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 166-175, 2005.
- COSTA, M. M. S. et al. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 613-616, 2008.
- COURA-VITAL, W. et al. Humoral and cellular immune responses in dog with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **The Veterinary Journal**, v. 190, p. 43-47, 2011.
- FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988.
- FIGUEIREDO, M. M. et al. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Histology and Histopathology**, v. 25, p. 877-87, 2010.
- GIUNCHETTI, R. C. et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 100-107, 2006.
- KEMP, M.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. The contrasting roles of CD4⁺ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. **Immunology Today**, v. 17, p. 13-16, 1996.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **Neglected Tropical Disease**, v. 6, p. 1-11, 2012.

PAPADOGIANNAKIS, E. I. et al. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 227-237, 2005.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 87-95, 2009.

SANTOS, W. L. C.; BADARÓ, J. D. R.; FREITAS, L. A. R. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, n. 92, p. 89-94, 2004.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, v. 18, p. 227-233, 2007.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*-specific IGG, IGG1 and IGG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 265-276, 2001.

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

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, p. 17-23, 2004.

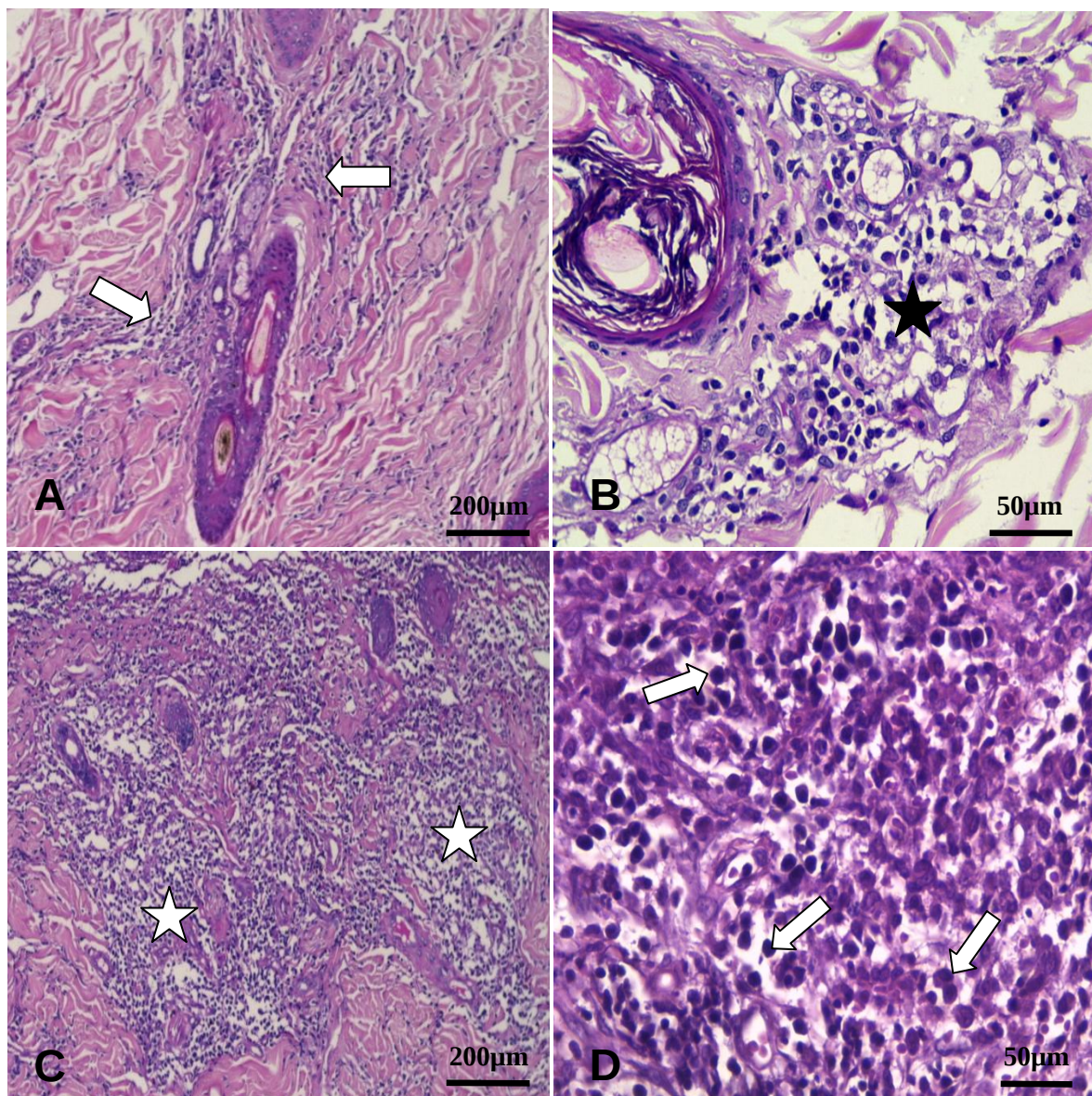


Figura 1: Fotomicrografias da pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Figura 1A: Infiltrado inflamatório granulomatoso leve na pele íntegra. Setas. H. E. 200µm.

Figura 1B: Infiltrado inflamatório focal, perifolicular, perivascular e periglandular na pele íntegra. Estrela. H. E. 50µm.

Figura 1C: Infiltrado inflamatório severo e difuso na derme de pele lesionada ulcerada. Estrela. H.E. 200µm.

Figura 1D: Infiltrado inflamatório granulomatoso com presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos na pele lesionada ulcerada. Setas. H. E. 50µm.

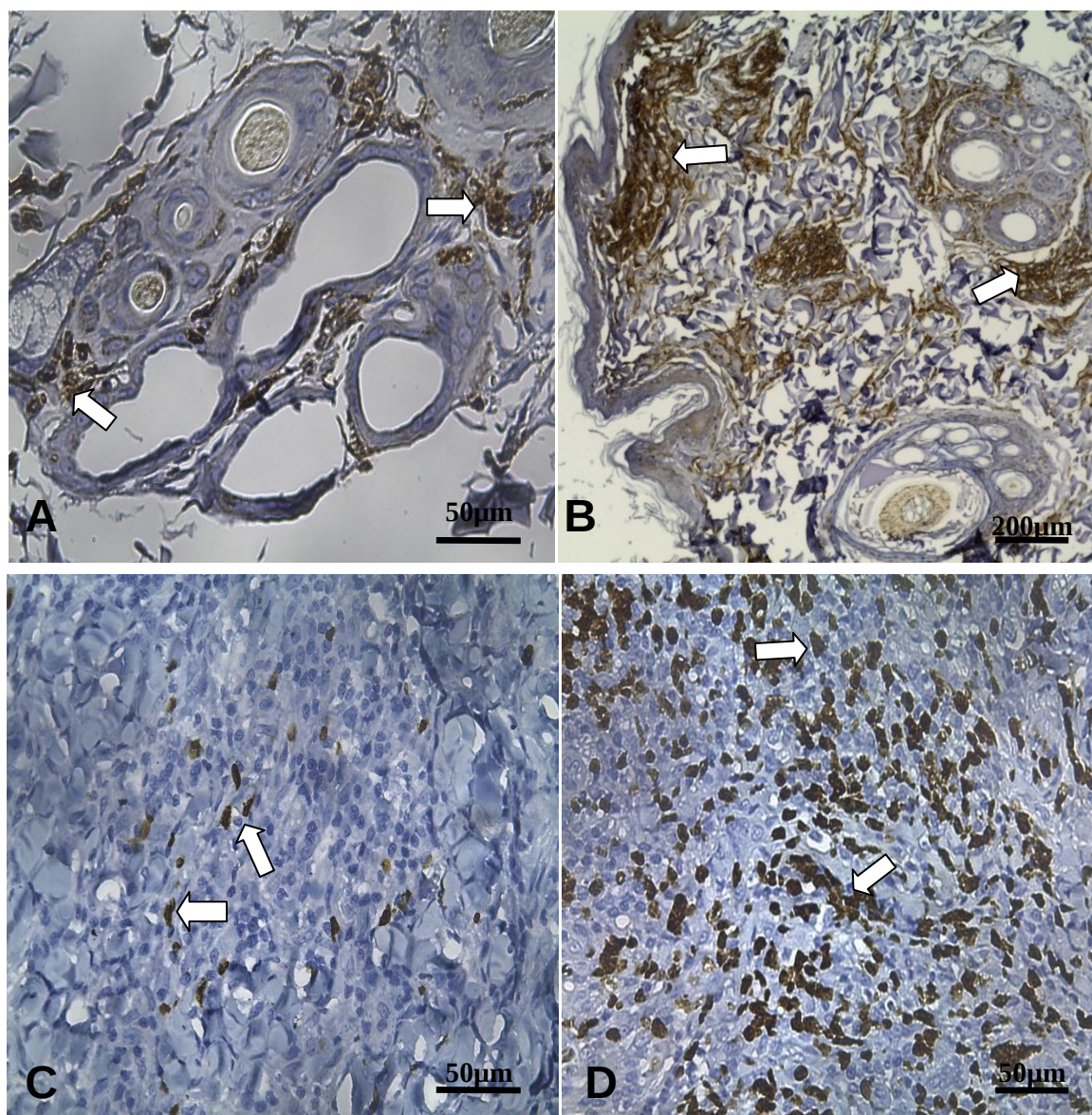


Figura 2: Fotomicrografias da pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à técnica de imuno-histoquímica.

Figura 2 A: Discreta imunomarcção positiva anti-MHC II na região perifolicular, perivascular e periglandular da derme de pele íntegra. Setas. IHQ. Envision. DAB. 50µm.

Figura 2 B: Moderada marcação positiva anti-MHC II na derme superficial e região perianexial da pele lesionada ulcerada. Setas. IHQ. Envision. DAB. 200µm.

Figura 2 C: Discreta imunomarcção positiva anti-macrófago na derme da pele íntegra. Setas. IHQ. LSAB. DAB. 50µm.

Figura 2 D: Intensa marcação positiva anti-macrófago na derme da pele lesionada ulcerada. Setas. IHQ. LSAB. DAB. 50µm.

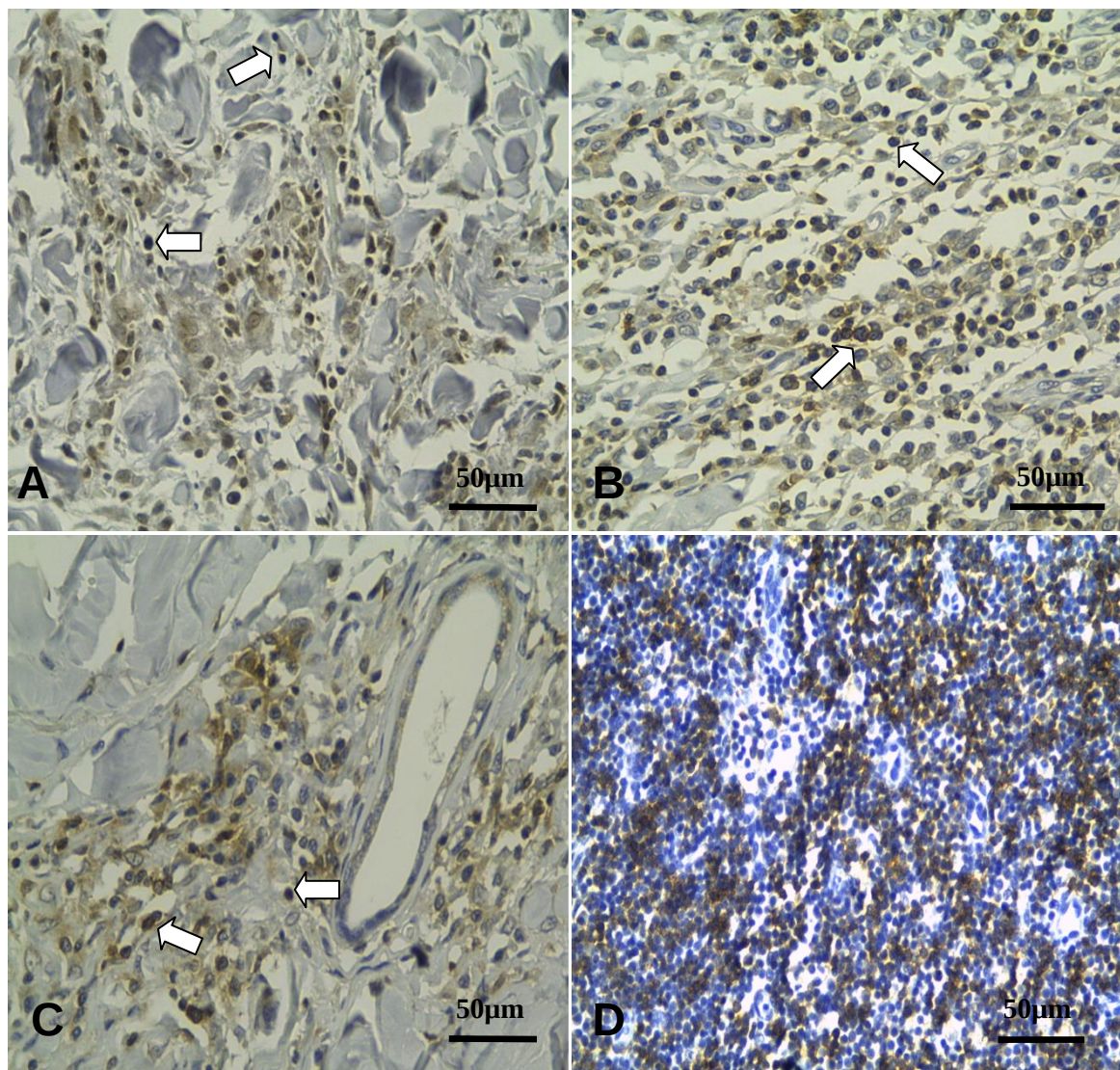


Figura 3: Fotomicrografias da pele e linfonodo de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à técnica de imuno-histoquímica.

Figura 3 A: Discreta imunomarcção positiva anti-CD3 na derme de pele íntegra. IHQ. LSAB. DAB. 50µm.

Figura 3 B: Intensa marcação positiva anti-CD3 na derme de pele lesionada ulcerada. IHQ. LSAB. DAB. 50µm.

Figura 3 C: Infiltrado de células positivas para anti-CD3, perivascular, na derme de pele íntegra. IHQ. LSAB. DAB. 50µm.

Figura 3 D: Controle positivo, mostrando a marcação para anti-CD3 em linfonodo de cão hígido. IHQ. LSAB. DAB. 50µm.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A técnica de imuno-histoquímica permitiu a quantificação da carga parasitária, reforçando a importância da pele como reservatório de formas amastigotas de *L. infantum*, com destaque para a pele íntegra que mesmo sem lesão macroscópica, pode favorecer a transmissão da doença.

A imunomarcção quantitativa dos linfócitos T (CD3), macrófagos e moléculas de MHC II foi determinada pela severidade da resposta inflamatória desempenhada na pele dos cães infectados, bem como pela carga parasitária, podendo atuar como método auxiliar para a caracterização clínica da Leishmaniose Visceral Canina.