

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E  
INFECTOLOGIA**

**Paula Tatiana Mutão Ferreira**

**Análise morfológica e morfométrica do fígado, baço, e rim de camundongos Balb/c  
experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*.**

**Uberaba-MG**

**2016**

**Paula Tatiana Mutão Ferreira**

**Análise morfológica e morfométrica do fígado, baço, e rim de camundongos Balb/c experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração “Parasitologia e Imunologia Aplicadas” (Linha de pesquisa: Estudo clínico, epidemiológico e controle das Leishmanioses), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Guimarães Faleiros.

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Ramirez

**Uberaba-MG**

**2016**

**Paula Tatiana Mutão Ferreira**

**Análise morfológica e morfométrica do fígado, baço, e rim de camundongos Balb/c experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração “Parasitologia e Imunologia Aplicadas” (Linha de pesquisa: Estudo clínico, epidemiológico e controle das Leishmanioses), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Ana Carolina Guimarães Faleiros – Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Profa. Dra. Angélica Oliveira Gomes  
Universidade Federal de Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr. Arnaldo Moreira Silva  
Universidade Federal de Uberlândia

*“Eu pedi forças... e Deus deu-me dificuldades para fazer-me forte.  
Eu pedi sabedoria... e Deus deu-me problemas para resolver.  
Eu pedi prosperidade... e Deus deu-me cérebro e músculos para trabalhar.  
Eu pedi coragem... e Deus deu-me obstáculos para superar.  
Eu pedi amor... e Deus deu-me pessoas com problemas para ajudar.  
Eu pedi favores... e Deus deu-me oportunidades.  
Eu não recebi nada do que pedi... mas eu recebi tudo de que precisava”.*

*(A Lição da Borboleta – Autor Desconhecido)*

## **Agradecimentos**

À DEUS, meu tudo, pela presença em todos os momentos, por me capacitar e dar forças para prosseguir nesta jornada, mesmo quando achava que era impossível.

Aos meus pais, Leidinéia e Eurípedes, pelo amor incondicional, esforço na minha educação, renúncia, constantes preocupações e orações. Sem vocês não seria nada.

Ao meu irmão Antônio Carlos, pelo apoio e amor.

Ao meu noivo Mário Sérgio, por estar sempre ao meu lado me incentivando e dando o seu apoio e amor.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Guimarães Faleiros, pela oportunidade concedida.

Ao meu co-orientador, Prof<sup>a</sup> Dr Luis Eduardo Ramirez Giraldo, pela disposição e incentivo, fundamentais para a concretização do trabalho.

Ao professor Dr. Carlo José Freire de Oliveira, pessoa “chave” na realização deste trabalho, pelos ensinamentos, disponibilidade, auxílio, incentivo em todos os momentos.

Aos colaboradores do projeto, professor Dr. João Santana e professora Dr<sup>a</sup>. Vanessa Carregaro, pelas contribuições no trabalho prático.

Aos colegas de laboratório e de mestrado pela amizade, partilha de conhecimento e solidariedade.

Aos que manusearem esta dissertação, por prestigiarem nosso trabalho com sua leitura.

Aos animais, por contribuírem com a ciência doando suas vidas.

E a todos que de alguma forma contribuíram para mais essa conquista.

## RESUMO

As leishmanioses são doenças infecciosas que produzem diferentes tipos de lesões dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida. Sabe-se que a espécie responsável por causar a leishmaniose visceral é a *Leishmania infantum* e esta infecção atinge órgãos-alvo como o fígado, baço e rim. O modelo experimental considerado suscetível à essa infecção é o camundongo Balb/c pois produz lesões semelhantes às dos humanos quando infectados pela referida espécie. Nosso objetivo foi analisar as características morfológicas e morfométricas do fígado, baço, e rim de camundongos Balb/c com 15, 30, 45 e 60 dias de infecção experimentalmente infectados com *Leishmania infantum*. Foram utilizados 25 camundongos divididos em cinco grupos de acordo com o tempo de infecção (L15 – 15 dias de infecção, L30 – 30 dias de infecção, L45 – 45 dias de infecção, L60 – 60 dias de infecção e o grupo controle). Após eutanásia nos referidos períodos de infecção, foram coletados os órgãos: baço, fígado e rim para avaliação da infectividade mediante PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e para análise histopatológica e morfométrica. Os fragmentos dos tecidos foram processados e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. A morfometria foi feita no programa ImageJ, para o rim, contagem de pontos para identificar área da matriz mesangial e área do tufo glomerular; para o fígado contagem de pontos para identificar área de hepatócitos degenerados e infiltrado inflamatório, e, para o baço, área das estruturas. Mediante à PCR, o teste demonstrou que todos os animais foram infectados pelo parasito. O fígado dos animais dos grupos L15, L30 e L45 apresentou uma coloração vermelho pálida enquanto que animais do grupo L60 apresentaram uma coloração vermelho-vinhosa semelhante ao grupo controle. O rim não apresentou diferenças macroscópicas e, no baço, foi observado um aumento considerável do órgão nos grupos dos animais infectados. Na quantificação da área de matriz mesangial nos glomérulos renais, houve diferença significativa entre os grupos L60 e L15, L30 e controle; e entre L45 e L15 ( $H=63,819$ ;  $p<0,001$ ). Na quantificação da área do tufo glomerular houve diferença significativa entre L60 e L15; L30 e controle ( $H=45,664$ ;  $p<0,001$ ). Na quantificação da área de degeneração hidrópica no fígado, houve diferença significativa entre todos os grupos de animais infectados com o grupo controle ( $H=44,506$ ;  $p<0,001$ ). Na análise da área de inflamação presente no tecido hepático, houve diferença significativa entre os grupos L15 e L30 com o grupo controle e entre o grupo L15 com os grupos L30, L45 e L60 ( $H=88,699$ ;  $p<0,001$ ). Na quantificação da área de polpa branca, houve diferença significativa do grupo L15 com o grupo L60 ( $H= 11,121$ ;  $p< 0,05$ ). Apesar de não haver diferença significativa, a polpa vermelha dos animais infectados aumentou durante o curso da infecção. Contudo, as lesões persistiram durante todo o curso de infecção estudado como a degeneração hidrópica e o infiltrado inflamatório presente no fígado, a esplenomegalia, o aumento de matriz mesangial nos glomérulos renais, os quais mostraram uma progressão com o aumento do período da infecção.

Palavras chave: Leishmaniose Visceral; *Leishmania infantum*, Balb/c; morfometria; histopatologia

## ABSTRACT

Leishmaniasis are infectious diseases that produces different kinds of lesions depending on the *Leishmania* species involved. It is known that the species responsible for causing visceral leishmaniasis is the *Leishmania infantum*, which infection target organs such as the liver, spleen and kidney. The experimental model considered susceptible to this infection is the Balb/c mouse, which lesions are similar to humans when infected by the referred species. Our objective was to analyze the morphological and morphometric characteristics of the liver, spleen and kidney on Balb/c mice infected for 15, 30, 45 and 60 days, experimentally infected with *Leishmania infantum*. Twenty-five mice were divided in five groups based on the infection time (L15 - 15 days of infection, L30 - 30 days of infection, L45 - 45 days of infection, L60 - 60 days of infection and the control group). After the euthanasia on the determined infection period, the following organs were collected: spleen, liver and kidney for infectivity evaluation by PCR (Polymerase Chain Reaction) and histopathological and morphometric analysis. Tissue fragments were processed and the microscope slides were stained with Hematoxylin and Eosin. The morphometry was performed on the software ImageJ; for the kidney, point counting was used to identify mesangial matrix and the glomerulus areas; for the liver, point counting was used to identify hepatocytes degeneration and inflammatory infiltrate areas and, for the spleen, the area of the structures. The PCR test demonstrated that all animals were infected by the parasite. The livers from the groups L15, L30 and L45 presented a pale-red coloration, while the group L60 presented a dark-red coloration, similar to the control group. The kidney did not present macroscopic differences, while a considerable growth was detected on the spleen of the infected animals. In the quantification of the mesangial matrix in the glomerulus area, there was a significant difference between the groups L60 and L15, L30 and the control group and also between L45 and L15 ( $H=63,819; p<0,001$ ). In the quantification of the glomerulus tuft area, there was a significant difference between L60 and L15; L30 and the control group ( $H=45,664; p<0,001$ ). In the liver hydropic degeneration area quantification, there was a significant difference between all infected groups and the control group ( $H=44,506; p<0,001$ ). The analysis on the inflammation area present on the hepatic tissue, there was a significant difference between the groups L15 and L30 when compared to the control group and between L15 when compared to L30, L45 and L60 ( $H=88,699; p<0,001$ ). The quantification on the white pulp area showed a significant difference between the groups L15 and L60 ( $H=11,121; p<0,05$ ). Despite no substantial difference, the red pulp of the infected animals increased in size during the course of the infection. However, lesions persisted during the entire infection course studied such as the hydropic degeneration and the inflammatory infiltration present on the liver, the splenomegaly and the mesangial matrix growth on the renal glomerulus, which presented progression with the increase of infection period.

Keywords: Visceral Leishmaniasis; *Leishmania infantum*; Balb/c; Morphometry; Histopathology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Os parasitos do gênero <i>Leishmania</i> dentro do vetor.....	18
Figura 2: Ciclo de vida da <i>Leishmania spp</i> .....	18
Figura 3: Local de inoculação por via intravenosa, no plexo venoso retro-orbital.....	27
Figura 4: Glomérulos com a grade de pontos (+) do programa morfométrico ImageJ...30	
Figura 5: Hepatócitos com a grade de pontos (+) do programa morfométrico ImageJ...31	
Figura 6: Regiões do baço analisadas pelo programa morfométrico ImageJ.....	32
Figura 7: Gel representativo dos produtos da PCR dos tecidos dos camundongos positivos para <i>L. infantum</i> utilizando os <i>primer JW11</i> e <i>JW12</i> .....	34
Figura 8: Rim direito dos animais dos grupos: controle, L15, L30, L45 e L60.....	35
Figura 9: Diferença dos glomérulos entre um animal do grupo controle e um do grupo com 30 dias de infecção.....	35
Figura10: Fígado coletado de animal não infectado e de um animal infectado com <i>Leishmania infantum</i> .....	37
Figura 11: Degeneração Hidrópica e infiltrado inflamatório no fígado de camundongos infectados com <i>Leishmania infantum</i> .....	37
Figura 12: Baço dos animais dos grupos: controle, L15, L30, L45 e L60.....	39
Figura 13: Células de Mott presentes do baço de camundongos infectados por <i>Leishmania infantum</i> .....	40
Figura 14: Comparação das medianas das áreas de matriz mesangial.....	41
Figura 15: Comparação das medianas das áreas do tufo glomerular.....	41
Figura 16: Correlação entre das áreas de matriz mesangial e tufo glomerular.....	42
Figura 17: Comparação das medianas das áreas de degeneração hidrópica no fígado...43	
Figura 18: Comparação das medianas das áreas de infiltrado inflamatório no fígado....43	

Figura 19: Correlação entre as áreas de degeneração hidrópica e infiltrado inflamatório no fígado.....	44
Figura 20: Comparação das medianas das áreas de hepatócitos normais.....	45
Figura 21: Correlação entre as áreas de polpa branca e polpa vermelha.....	46
Figura 22: somatório das áreas de polpa branca e polpa vermelha de cada um dos grupos.....	47
Figura 23: razão entre as áreas de polpa branca e a polpa vermelha de cada um dos grupos.....	48

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Comparação da mediana da área de polpa branca do baço entre os grupos com 15 dias de infecção (L15), 30 dias de infecção (L30), 45 dias de infecção (L45), 60 dias de infecção (L60) e grupo controle (C).....45

Quadro 2: Comparação da mediana da área de polpa vermelha do baço entre os grupos com 15 dias de infecção (L15), 30 dias de infecção (L30), 45 dias de infecção (L45), 60 dias de infecção (L60) e grupo controle (C).....46

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- DH – Degeneração Hidrópica
- ELISA – ensaio imunoenzimático
- HE – Hematoxilina e Eosina
- II – Infiltrado Inflamatório
- LV – Leishmaniose Visceral
- LC – Leishmaniose cutânea
- LCD – Leishmaniose cutânea-difusa
- LMC – Leishmaniose mucocutânea
- LVC – Leishmaniose Visceral Canina
- MM – Matriz Mesangial
- MS – Ministério da Saúde
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- RIFI – Imunofluorescência indireta
- SPB – Somatório de Polpa Branca
- SPV – Somatório de Polpa Vermelha
- TG – Tufo Glomerular

## LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca registrada.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Aspectos gerais e epidemiologia.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Transmissão e ciclo de vida do parasito.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Modelo murino e o estudo da Leishmaniose Visceral.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Aspectos morfológicos do baço, fígado e rim na Leishmaniose Visceral.....</b>	<b>20</b>
<b>1.6 Métodos diagnósticos da Leishmaniose Visceral.....</b>	<b>23</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Modelo experimental .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.1 Origem da cepa .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.2 Camundongos.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.3 Método de infecção.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.4 Cultura celular.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.5 Eutanásia.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 HISTOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.1 Processamento do baço, fígado e rim .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.2 Coloração das lâminas por hematoxilina-eosina (HE).....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....</b>	<b>29</b>

<b>4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.1 Rim e Fígado .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4.2 Baço.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5 EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....</b>	<b>33</b>
<b>4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>33</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Avaliação da infectividade mediante PCR.....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Análise histopatológica do baço, fígado e rim.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3 Análise Morfométrica.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3.1 Rim.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3.2 Fígado.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3.3 Baço.....</b>	<b>45</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais e epidemiologia

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, de caráter zoonótico, não contagiosas, de transmissão vetorial, causadas por diferentes espécies morfológicamente semelhantes de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Estas espécies são membros da família *Trypanosomatidae* e pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, incluindo organismos unicelulares caracterizados pela presença de flagelo único e de uma organela rica em DNA, semelhante à mitocôndria, o cinetoplasto (LODGE & DESCOTEUAX, 2005).

O gênero *Leishmania* é um protozoário digenético que apresenta uma forma flagelada denominada promastigota com dimensões entre 14 e 20  $\mu\text{m}$  de comprimento por 1,5 a 4  $\mu\text{m}$  de largura e possui núcleo situado no terço médio da célula e um cinetoplasto geralmente localizado entre a parte anterior e o núcleo. Esta forma se encontra presente no intestino médio do hospedeiro invertebrado que é um díptero da subfamília *Phlebotominae* (gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo). Nestes vetores os promastigotas realizam um ciclo fisiológico passando por diferentes estágios: promastigotas procíclicos, nectomonados, leptomonados, haptomonados e, finalmente, em promastigotas metacíclicos que são formas parasitárias que não sofrem mais nenhum outro processo de transformação e são as formas infectantes para os hospedeiros vertebrados (ROSS, 1903). Os promastigotas metacíclicos ao serem inoculados pelos vetores nos hospedeiros vertebrados se transformam em amastigotas que são formas ovaladas ou esféricas com diâmetro variando de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$  e se localizam em vacúolos parasitóforos no interior dos macrófagos do hospedeiro, onde se multiplicam por divisão binária (HERWALDT, 1999), chegando a causar infecções na pele conhecida como leishmaniose tegumentar (cutânea, LC; mucocutânea, LMC; ou difusa, LCD) e também infecções generalizadas conhecidas como leishmaniose visceral, LV (MURRAY, 2005; HOTEZ, 2007; HOTEZ, 2010).

Acredita-se que existam mais de vinte espécies que podem chegar a causar leishmanioses, sendo as mais importantes: *Leishmania (Leishmania) chagasi* responsável por causar a LV no Novo Mundo, enquanto que no Velho Mundo é causada por *Leishmania (Leishmania) donovani* e no sudeste da Europa e na área Mediterrânea por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Atualmente, alguns autores consideram as

espécies *L. chagasi* e *L. infantum* idênticas identificando-as como *Leishmania infantum-chagasi*. Os seres humanos são os únicos reservatórios conhecidos de *L. donovani* no Velho Mundo, enquanto os caninos, silvestres e domésticos, marsupiais e roedores são os reservatórios principais de *L. infantum* e *L. chagasi* (GUERIN, 2002).

A LV em humanos é uma enfermidade infecciosa generalizada, cujas manifestações clínicas dependem da resposta imunológica do hospedeiro infectado. Essas podem ser divididas em LV clássica, oligossintomática, aguda ou assintomática (FUNASA, 2000).

Humanos, cães e hamster (modelo experimental mais frequentemente utilizado para o estudo da LC e LV) apresentam sinais e sintomas clínicos severos durante a infecção visceral, enquanto que, camundongos apresentam poucos sinais clínicos e sintomas brandos ou, ainda, podem não apresentar todos esses sinais os quais dependerão do tamanho do inóculo utilizado na infecção experimental. A progressão da doença em camundongos dependerá também da via de infecção e do tipo de cepa de *Leishmania* utilizadas (HANDMAN, 2001; HOMMEL et al, 1995; MELBY et al, 2001; REQUENA et al, 2000; CARRION et al, 2006).

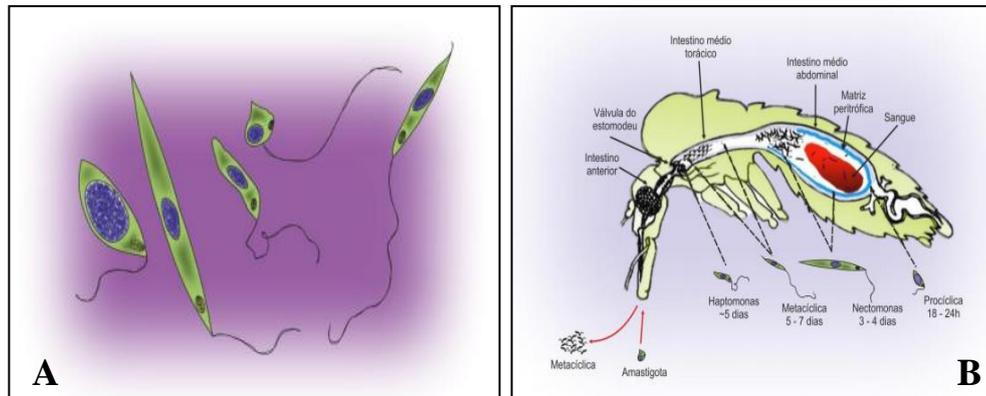
A leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas mais prevalente afetando a saúde pública mundialmente. Sobre a distribuição mundial das leishmanioses, estudos estimam que pelo menos 20 milhões de pessoas estão infectadas por protozoários do gênero *Leishmania* em 98 países considerados endêmicos. A forma visceral é a forma mais severa da doença podendo ser fatal. Anualmente, são identificados em torno de 500.000 novos casos de leishmaniose visceral e, no Brasil, são registrados pelo menos 3000 casos confirmados (MURRAY, 2005; HOTEZ, 2007; HOTEZ, 2010). Dentre os casos de leishmaniose visceral identificados, a maior prevalência é em cães, sobrepondo-se ao número de casos em humanos, pois é a partir deste animal que ocorre a transmissão ao homem por apresentarem um intenso parasitismo na pele (SVS, 2003; ABRANCHES et al, 1991).

## **1.2. Transmissão e ciclo de vida do parasito**

Além da transmissão natural pela picada da fêmea de *Lutzomyia longipalpis* esta também pode ser transmitida por outros mecanismos como: auto-inoculação por material perfuro cortante, seringas contaminadas em laboratório, transfusão sanguínea e transmissão congênita (GENARO, 2003).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. No entanto, foi observado por LAINSON e SHAW em 1987, um desenvolvimento distinto das diferentes espécies do parasito no vetor levando aos autores a classificar as *Leishmanias* nos subgêneros *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)*. Os membros do subgênero *Viannia*, dirigem-se para o intestino posterior ao redor do piloro e íleo (desenvolvimento peripilário), onde colonizam e se desenvolvem. Nesses locais, ocorre a transformação de promastigotas em leptomonados (paramastigotas?) os quais ainda se multiplicam e migram através do estômago em direção à faringe do inseto. Já os membros do subgênero *Leishmania* se desenvolvem exclusivamente nos intestinos anterior e médio de seus vetores (desenvolvimento suprapilário), transformando-se em leptomonados, (haptomonados - paramastigotas?) nesses locais, colonizando o esôfago e a faringe (Figura 1). Na faringe, ambos os subgêneros diferenciam-se em promastigotas metacíclicos (forma infectante para o hospedeiro vertebrado) e migram para o aparelho bucal do inseto para serem regurgitadas e inoculadas no próximo hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 5 a 7 dias. Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Um dos componentes da saliva do *Lutzomyia longipalpis* é um importante vasodilatador e imunossupressor, o maxadilan, que exerce o papel de anticoagulante ao impedir a agregação plaquetária, além de ter ação quimiotática e imunorreguladora em monócitos e macrófagos, respectivamente, inibindo a estimulação dos últimos e reduzindo a capacidade destas células de produzir óxido nítrico ao fagocitar as *Leishmanias* (MICHALIK, 2005). Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Figura 2).

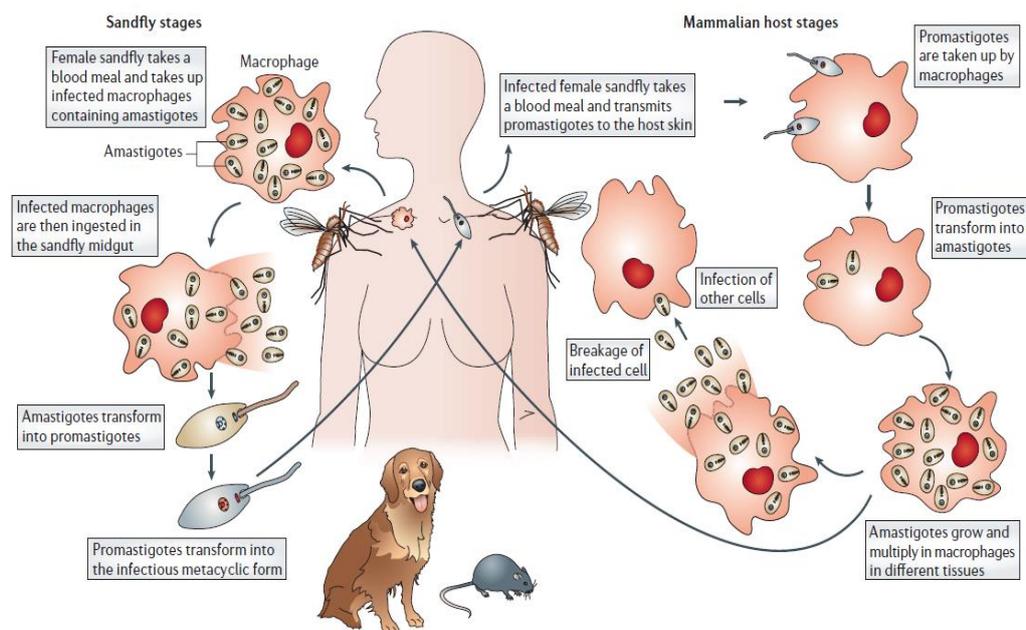
Figura 1. Os parasitos do gênero *Leishmania* dentro do vetor.



(A): Os morfotipos de *Leishmania* encontrados dentro dos flebotomíneos vetores. Observa-se da esquerda para direita: promastigota procíclica, promastigota nectomonado, promastigota haptomonado, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica. (B): O ciclo de vida da *Leishmania* se inicia no vetor.

Fonte: PIMENTA et al, 2012.

Figura 2. Ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Fonte: LIPOLDOVÁ e DEMANT, 2006

### **1.3. Manifestações clínicas da Leishmaniose Visceral**

A forma clássica da LV é caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo levando à caquexia e até mesmo ao óbito caso o paciente não receba tratamento específico (GALVÃO-CASTRO, 1984). Além disso, observam-se as formas oligossintomáticas (caracterizada por febre baixa ou ausente, hepatomegalia e discreta esplenomegalia), aguda (caracterizada por início brusco) e assintomática, que se caracteriza pela presença do parasito em baixa quantidade e de uma imunidade celular e presente principalmente em adultos de áreas endêmicas (FUNASA, 2000).

### **1.4. Modelo murino e o estudo da Leishmaniose Visceral**

Os murinos, especialmente camundongos, infectados experimentalmente com *Leishmania* são animais modelos mais adequados para estudar esta doença. Os dados obtidos usando tais modelos são importantes para uma melhor compreensão da doença em seres humanos devido a semelhanças na fisiologia e a vantagem proporcionada pelo perfil de infecção uniforme dentro de cada linhagem de camundongo. É importante ressaltar que além das características genéticas dos camundongos que definem padrões de progressão ou resolução da infecção, existem fatores adicionais, que talvez influenciem nessas características, tais como: o tamanho do inóculo, o local de inoculação, a cepa do parasito de escolha e a sua procedência ou fonte de isolamento. (PEREIRA e ALVES, 2008). A infecção por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* não é letal em camundongos e diferentes cepas de camundongos podem apresentar cargas parasitárias variadas. Conseqüentemente, a suscetibilidade e a resistência são definidas de acordo com a magnitude da carga parasitária no baço e no fígado após a infecção. Camundongos BALB/c são suscetíveis a infecção e apresentam visceralização com as espécies *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* (GORCZYASKI, 1982) sendo considerados hoje os melhores modelos para o estudo de LV. Estes animais tem sido utilizados para o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose visceral (AFRIN et al, 2000; CARRIÓN et al, 2006; ZANIN et al, 2007). Estudos recentes tem demonstrado que mecanismos imunes são necessários para o desenvolvimento da resposta imune órgão-específico, a qual pode eliminar parasitas do fígado mas não do baço (KAYE et al, 1995; CARRIÓN et al, 2006). Contudo, os camundongos Balb/c são considerados vulneráveis, visto que a infecção progride nas duas primeiras semanas e, após esse

tempo, pode ser controlada pela resposta imune do hospedeiro, dependendo da infectividade do inoculo utilizado nos animais (MURRAY et al, 1987) e, além disso, desenvolvem títulos elevados de anticorpos e o parasito, frequentemente, desloca-se para locais distantes do ponto de inoculação, como a medula óssea, o baço e o fígado (MILES et al, 2005). Os estudos em camundongos Balb/c como modelos experimentais para o desenvolvimento de Leishmaniose visceral têm sido atualmente explorados na tentativa de estabelecer um padrão de infecção crônica já que apresentam um curso de doença semelhante à LV humana (AHMED et al, 2003). Estudos recentes nestes camundongos têm mostrado também que a patologia das leishmanioses é mediada por imunidade com a participação de células T (SILVA, 2007), e a resistência e susceptibilidade estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento das respostas Th1 ou Th2, respectivamente.

Em outras linhagens de camundongos como a linhagem C57BL/6 observa-se uma resposta imune Th1 no início da infecção o que impede o crescimento dos parasitas, tornando-se então, um fenótipo de auto-cura (LEHMANN et al, 2000). Os camundongos Balb/c contrariamente, produzem uma resposta imune inicial do tipo Th2, o que resulta em uma não-cura da lesão e, conseqüentemente, exacerbação da doença (HIMMELRICH et al, 2000).

Wilson et al, 2005, em estudo realizado em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) chagasi*, para a avaliação da taxa e magnitude da multiplicação do parasito em diferentes órgãos, demonstraram a elevação inicial da carga de parasitos no fígado, seguido da resolução espontânea por se tratar de uma infecção auto-limitante (MURRAY, 2001). Por outro lado, ao mesmo tempo em que ocorre a resolução hepática da infecção, a multiplicação de amastigotas no baço é descontrolada e o dano tecidual é comum (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004). A carga parasitária no baço permanece mínima no pico da infecção hepática e eleva-se após a resolução da doença no fígado (WILSON et al, 2005).

### **1.5.Aspectos morfológicos do baço, fígado e rim na Leishmaniose Visceral**

O principal substrato histopatológico na LV é a multiplicação de amastigotas em células mononucleares fagocíticas dos órgãos internos tais como o baço, fígado e medula óssea (OLIVEIRA, et al, 1993), ocorrendo hiperplasia e hipertrofia das células. Outros órgãos como os rins também são afetados durante a progressão da infecção,

observando-se inflamação intersticial nos rins e fígado, mas a patogênese ainda não está bem esclarecida (DUARTE e CORBETT, 1994).

A fase da doença no fígado é considerada tardia após a segunda semana de infecção. É nesse momento que a resposta imunológica inicia uma etapa determinante, caracterizada pela chegada ao fígado de linfócitos T ativados (ENGWERDA, KAYE, 2000; ENGWERDA, ATO, KAYE, 2004; KAYE et al, 2004).

Análises histopatológicas do fígado de camundongos BALB/c desafiados com *Leishmania donovani* mostraram a formação de uma estrutura capaz de conter a infecção, denominada de granuloma. Essa estrutura começa a ser formada através da ação de células mononucleares de defesa, que cercam gradualmente as células de Kupffer parasitadas, formando uma espécie de manta de contensão em torno delas. As primeiras células a aparecerem em torno das células de Kupffer são granulócitos e monócitos, sendo possível identificar neutrófilos e eosinófilos nessa etapa inicial. A chegada de linfócitos T CD4+ e TCD8+ é iniciada 14 dias após a inoculação da *L. donovani*, porém somente depois da quarta semana é que a estrutura está completamente formada. Nesse momento, a resposta imunológica no fígado é capaz de induzir uma suficiente e progressiva redução na quantidade de amastigotas no interior das células de Kupffer, o que começa a ser visualizado com o surgimento cada vez maior de granulomas estéreis (Mc ELRATH, MURRAY, COHN, 1988; MURRAY, 2001). A resistência hepática é efetivada à medida que mais granulomas maduros vão sendo formados. Essas estruturas são eficientes na destruição dos invasores, fazendo com que o número deles dentro do granuloma esteja próximo a zero na oitava semana após infecção (NIETO et al, 2011).

O baço é o maior órgão linfóide do corpo (WESTERMANN e PABST, 1992) e corresponde à maior unidade do sistema mononuclear fagocitário (JANNINIET et al., 2003). É um órgão de consistência mole e muito vascularizado (AGUIAR et al., 2008). O baço geralmente aumenta de tamanho quando está envolvido em inflamações sistêmicas, sendo nestes casos denominado baço ativado (PEREIRA et al., 1999). Este órgão desempenha uma função central na leishmaniose visceral e está infectado em todos os casos da doença. O baço mantém a infecção durante todo o curso da infecção enquanto que, em outros órgãos como o fígado, onde o crescimento do parasito se dá rapidamente, com poucas semanas ocorre resolução espontânea, como já comentado. A replicação dos parasitos no baço começa tarde e ocorre lentamente e, este órgão, serve como um abrigo seguro para que as espécies de *Leishmania* sobrevivam por um longo

prazo (WILSON et al., 2005). O índice de parasitismo no baço é usado como critério clínico de resposta terapêutica na LV humana. O baço se torna um local evidente de interação entre o sistema imunológico e a *Leishmania* em todo o curso da infecção, pois todos os participantes obrigatórios da resposta imune contra o parasito estão presentes em grandes quantidades, como por exemplo, antígenos, células apresentadoras de antígenos e linfócitos capazes de responder a estes antígenos (SANTANA et al., 2008).

Microscopicamente, o baço é dividido em um compartimento denominado polpa vermelha, caracterizada pela abundância de eritrócitos, e outro denominado polpa branca, formado por grandes nódulos de tecido linfóide. O sangue é filtrado na polpa vermelha, enquanto a polpa branca é responsável pela defesa imunológica específica contra antígenos presentes no sangue circulante (KRAAL, 1992). Mudanças no microambiente do baço têm sido identificadas em infecções experimentais as quais podem ser vistas na leishmaniose visceral. Dentre as alterações causadas pela doença estão: presença de granulomas e de parasitos na polpa vermelha e outras alterações na polpa branca, como atrofia e perda da definição estrutural, redução do número e tamanho dos folículos linfóides e diminuição dos centros germinativos e da zona marginal (SANTANA et al., 2008).

Apesar de evidências claras sobre o comprometimento renal na LV, pouco se conhece sobre as alterações renais intersticiais e tubulares, em seus aspectos histopatológicos, morfométricos e ultra-estruturais (CARAVACA et al., 1991). Para entender a natureza, a extensão e a gravidade das lesões renais na LV, bem como fornecer parâmetros para uma classificação mais adequada, é necessário o aprofundamento das investigações sobre as mesmas.

Dentre as alterações observadas nos rins provocadas pela leishmaniose visceral, podemos destacar a nefrite intersticial. Do ponto de vista fisiopatológico, a nefrite intersticial é uma lesão importante (OLSEN et al., 1986), pois a alteração da função renal está mais relacionada com alterações intersticiais, do que com alterações glomerulares (BOHLE et al., 1987). A região do rim mais atingida é a cortical e o processo pode variar entre os graus discreto, moderado e intenso. No interstício é observado um grande infiltrado inflamatório, principalmente em torno de pequenos vasos, não sendo evidenciadas vasculite e nem agressão da membrana basal tubular ou do epitélio tubular. Formas amastigotas raramente são identificadas no rim. No compartimento glomerular, ocorre hiperplasia e hipertrofia das células do mesângio e da matriz mesangial, sem comprometimento da membrana basal glomerular (DUARTE, et

al., 1983). Além dessas alterações, ainda há a deposição de imunocomplexos circulantes no mesângio.

### **1.6. Métodos diagnósticos da Leishmaniose Visceral**

O diagnóstico da LV envolve métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares e apesar de grande quantidade de testes diagnósticos disponíveis, continua representando um desafio, pois não existe nenhum método com sensibilidade e especificidade máximas, capazes de oferecer um diagnóstico preciso das diferentes formas de apresentação da doença (IKEDA e FEITOSA, 2007). Como métodos convencionais de diagnóstico laboratorial da LV, são empregados o exame parasitológico direto por meio de biópsias e as técnicas sorológicas. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) são os testes sorológicos recomendados pelo Ministério da Saúde (MS) para estudos de soroprevalência em inquéritos caninos amostrais e censitários. Para áreas não endêmicas, o MS indica o exame parasitológico direto como método confirmatório para cães com sorologia positiva em virtude de sua elevada especificidade (BRASIL, 2006). Os métodos sorológicos possuem elevada sensibilidade, no entanto têm sido relatadas reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas e outras tripanossomoses (BANETH e AROCH, 2008, GOMES et al., 2008., TRONCARELLI et al., 2008). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método que apresenta alta sensibilidade e especificidade na detecção direta do DNA, no entanto há restrições para a sua aplicação em inquéritos epidemiológicos em razão do elevado custo dos equipamentos, da necessidade de pessoal altamente qualificado e de dificuldades inerentes à padronização da técnica (GOMES et al., 2007).

## 2. JUSTIFICATIVA

A maioria dos estudos da leishmaniose visceral no hospedeiro vertebrado tem tido como foco, a avaliação de testes parasitológicos diretos e indiretos para seu diagnóstico, parâmetros imunológicos tanto de imunidade humoral como celular, tratamento e, atualmente o desenvolvimento de vacinas para o controle da doença. No entanto, não é dada a importância necessária às avaliações morfológicas das lesões produzidas pelo parasito (HOMMEL et al, 1995, MELBY et al, 2001 e REQUENA et al, 2001). Além disto, existem poucos trabalhos experimentais morfológicos realizados em camundongos suscetíveis onde tem sido analisados especialmente fígado e baço por ser considerados os principais órgãos alvo. Ocasionalmente tem-se observado lesões no rim que podem ser fatais para esses animais, porém esses processos não têm sido mensurados neste órgão nem no baço nem no fígado.

Dessa forma, torna-se importante avaliar os parâmetros morfológicos das lesões decorrentes da infecção por *Leishmania infantum* produzida experimentalmente em camundongos Balb/c identificando os principais órgãos afetados e as consequentes alterações oriundas da forma visceral da doença causada pela referida espécie.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as características morfológicas e morfométricas do fígado, baço, e rim de camundongos Balb/c isogênicos com 15, 30, 45 e 60 dias de infecção experimental com *Leishmania infantum*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar macroscópica e microscopicamente o baço, fígado e rim dos animais infectados e não infectados;
- ✓ Confirmar mediante a PCR a presença de DNA do parasito em Baço e Fígado de camundongos infectados;
- ✓ Quantificar no baço a área de polpa branca, polpa vermelha e área total nos camundongos infectados e não infectados;
- ✓ Quantificar no fígado a área total de hepatócitos degenerados e não degenerados em camundongos infectados e não infectados e a área do infiltrado inflamatório intersticial;
- ✓ Quantificar nos glomérulos renais a área de matriz mesangial e de tufo glomerular em camundongos infectados e não infectados;
- ✓ Correlacionar a área de polpa branca com a de polpa vermelha nos camundongos infectados e não infectados;
- ✓ Correlacionar a área de hepatócitos degenerados e de infiltrado inflamatório em camundongos infectados e não infectados;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MODELO EXPERIMENTAL**

#### **4.1.1 Origem das cepas**

A cepa HU-USF 14 de *Leishmania infantum* utilizada neste estudo é proveniente do laboratório de Imunoparasitologia da Universidade de São Paulo – USP, de Ribeirão Preto/SP, cedida pelo professor Doutor João Santana da Silva.

#### **4.1.2 Camundongos**

Foram utilizados 25 camundongos Balb/c, fêmeas adultas (7 a 8 semanas de idade) pesando entre 18 e 22 gramas. Estes foram divididos em cinco grupos, sendo um grupo controle e os outros quatro de acordo com o número de dias de infecção (15, 30, 45 e 60 dias de infecção) denominados L15, L30, L45 e L60, respectivamente. Os animais eram procedentes do biotério do Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e, posteriormente, foram mantidos no Biotério da Disciplina de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas e Naturais – UFTM, em condições adequadas de temperatura, umidade e disponibilidade de água e alimento "*ad libitum*".

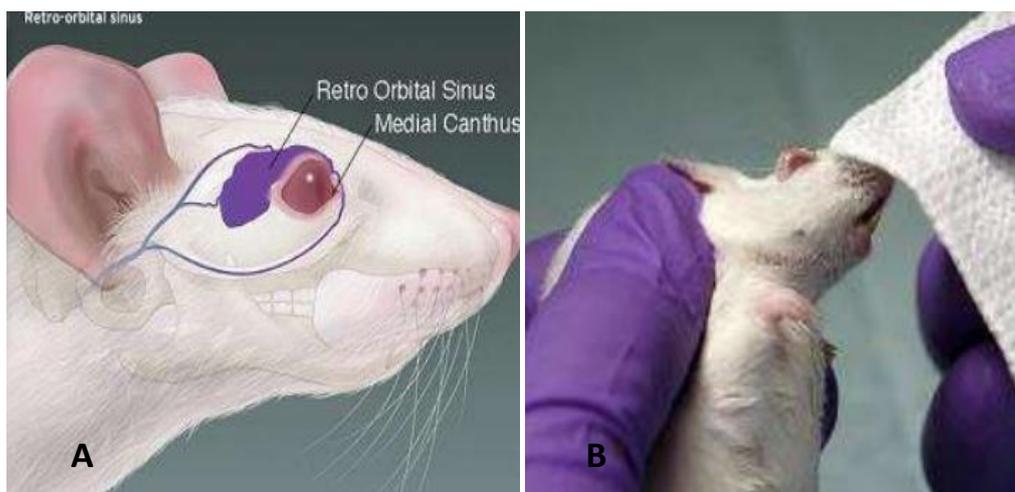
#### **4.1.3 Método de infecção**

A infecção de 21 camundongos procedeu-se pela inoculação de formas de promastigotas metacíclicas de *Leishmania infantum* da cepa HU-USF 14, com a dose infectante de  $10^7$  promastigotas/mL, perfazendo um volume de 100  $\mu$ L, por via intravenosa, no plexo venoso retro-orbital (PINELLI et al, 1994) (Figura 3). Para esse procedimento, o animal foi anestesiado com quetamina (50mg/kg) e xilazina (5mg/kg) mantido em posição lateral para inoculação (CURL e PETERS, 1983).

Foi realizada a inoculação de PBS para injeção em camundongos do grupo controle com o mesmo volume e pela mesma via de inoculação citada anteriormente.

O dia da inoculação foi considerado o dia zero da infecção.

Figura 3: Local de inoculação por via intravenosa, no plexo venoso retro-orbital.



(A): Local de inoculação da cepa, plexo venoso retro-orbital. (B): Imagem logo após a inoculação.

Fonte: [http://www.theodra.com/rodent\\_laboratory/blood\\_collection.html](http://www.theodra.com/rodent_laboratory/blood_collection.html). Acesso em: 12/09/2016.

#### 4.1.4 Cultura celular para obtenção das formas promastigotas metacíclicas

Os camundongos foram infectados por via intravenosa pelo plexo intra-orbital com  $1 \times 10^7$  formas promastigotas metacíclicas da cepa HU-USF 14 de *L. infantum* mantidas a 25°C em meio Schneider (Sigma-Co, Saint Louis, EUA) suplementado com soro bovino fetal a 20% (Cultilab, Campinas, SP - Brasil), 2% de urina humana masculina, 2mM de L-glutamina, e 20 µg/mL de gentamicina (Schneider 20 %) em garrafas de cultura estéreis (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA).

Os camundongos Balb/c foram infectados com promastigotas metacíclicas da cepa citada na proporção de  $10^7$  parasitos em 100µl de PBS 1X, os quais foram contados na câmara de Neubauer em quatro quadrantes.

#### 4.1.5 Eutanásia

Foi realizada eutanásia dos animais normais e infectados por deslocamento cervical após o período de 15, 30, 45 e 60 após infecção e, foram coletados os seguintes órgãos: baço, fígado e rim direito, dos quais, uma pequena porção de cada órgão foi

congelada para extração de DNA e, o restante de cada um armazenado em formaldeído 10% e posteriormente processado para estudos histopatológicos.

**Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) sob o protocolo de número 387.**

## **4.2 HISTOLOGIA**

### **4.2.1 Processamento do baço, fígado e rim**

Para análise histopatológica, amostras de tecido hepático, baço e do rim direito foram fixadas em formaldeído a 10%, por 48h. Após esse período, os tecidos foram preparados e depois transferidos para soluções crescentes de álcool (I, II, III e IV) para desidratação permanecendo em cada uma delas por 50 minutos. Posteriormente, foram submetidos a uma solução de álcool/xilol (50% /50%) por 15 minutos. Em seguida, os tecidos foram diafanizados em xilol I, II e III permanecendo 30 minutos em cada um deles e, logo, imersos em parafina I e II, por uma hora em cada uma delas. Após esse processo, os tecidos foram incluídos em parafina a qual foi colocada em pequenas formas para que depois de solidificada formasse pequenos blocos. Estes foram cortados com auxílio do micrótomo obtendo-se, cortes de 4µm de espessura os quais passaram por banho-maria a 51°C e foram dispostos em lâminas. As lâminas foram incubadas a 60°C para fixação do corte.

### **4.2.2 Coloração das lâminas por hematoxilina-eosina (HE)**

Para a coloração das lâminas com HE, as lâminas foram lavadas em xilol para retirar o excesso de parafina. Em seguida, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool (I, II e III), lavados em água corrente e depois colocados na Hematoxilina de Harris por cinco minutos. Após esse período as lâminas foram retiradas da hematoxilina, lavadas em água corrente, passadas em álcool-ácido, e por 10 segundos no hidróxido de amônio. A seguir foram passadas novamente na água, no álcool e, depois colocadas em eosina, onde permaneceram por um minuto. Após as lâminas serem retiradas da eosina, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (I, II, III e IV), diafanizados em xilol (I, II e III) e as lâminas foram montadas com duas gotas de Entellan (Merck®) e a lamínula posicionada sobre o corte.

### **4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA**

Os cortes dos diferentes órgãos (fígado, baço e rim) foram analisados diretamente em microscópio de luz comum, mediante objetiva 40x para o rim e 20x para fígado e baço, com o objetivo de descrever as lesões observadas. A análise histopatológica do rim constou de avaliação da região cortical de um dos compartimentos renais: os glomérulos. No fígado foi avaliado todo o parênquima: espaço porta, zona 1 (periportal), zona 2 (intermediária) e zona 3 (centro lobular). Nessas regiões foram avaliadas alterações degenerativas e presença de infiltrado inflamatório. No baço, foram avaliadas as polpas branca e vermelha.

### **4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA**

#### **4.4.1 Rim e Fígado**

Para a análise histopatológica morfométrica do rim, baço e fígado as lâminas foram coradas com HE e examinadas em microscópio de luz comum (Nikon eclipse E400) utilizando-se uma câmera de vídeo Nikon Digital Sight (DS-Fi1) acoplada ao microscópio que envia as imagens a um computador contendo o programa Motic Images Plus 2.0. Posteriormente, essas imagens foram analisadas no programa ImageJ (NIH, USA). As imagens digitalizadas foram obtidas de um corte longitudinal do rim direito, corte longitudinal do lobo direito do fígado e corte transversal do baço. Cada lâmina de HE apresentava um corte contendo os três fragmentos de: rim, baço e fígado.

Para a morfometria do rim e fígado foi utilizada a metodologia da contagem de pontos (Software ImageJ).

Para análise do rim utilizaram-se fragmentos correspondentes ao corte longitudinal do órgão abrangendo os pólos superior, médio e inferior. Utilizou-se de uma grade de 165 pontos (11 x 15). Foram contados os pontos que coincidiram somente com a matriz mesangial e, posteriormente, os pontos totais do tufo glomerular de todos os glomérulos de cada campo, sendo que cada ponto corresponde a uma área pré-definida de  $930,23 \mu\text{m}^2$  (Figura 4).

No fígado foi utilizada uma grade de 336 pontos (16x21) e foram contados os pontos que coincidiram somente com hepatócitos com degeneração hidrópica, células

inflamatórias, artefatos e hepatócitos normais separadamente, sendo que cada ponto corresponde a uma área pré-definida de  $934,87 \mu\text{m}^2$  (Figura 5).

Para a determinação do número de campos representativos para cada análise utilizou-se a metodologia descrita por MANDARIM-DE-LACERDA, 2003:

Volume = número de pontos coincidentes com a estrutura/número total de pontos

Erro padrão relativo = 0,05

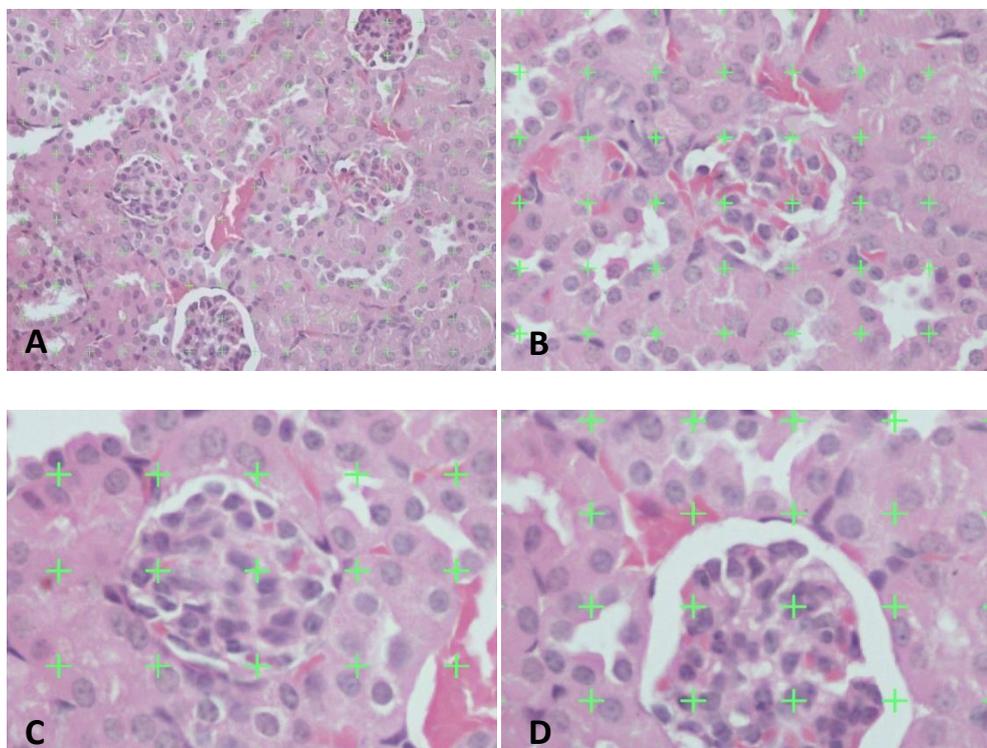
Erro padrão relativo =  $\sqrt{(1-\text{Volume})}$  /número de pontos

Número de pontos corrigido = número de pontos calculado/volume

Número de campos = número de pontos corrigido/número de pontos da grade

Dessa forma, analisaram-se todos os glomérulos presentes em duas imagens do fragmento de rim de cada animal e quantificou-se a área de matriz mesangial e a área total de cada tufo glomerular. No fragmento de fígado analisaram-se sete imagens de cada animal para realizar as quantificações.

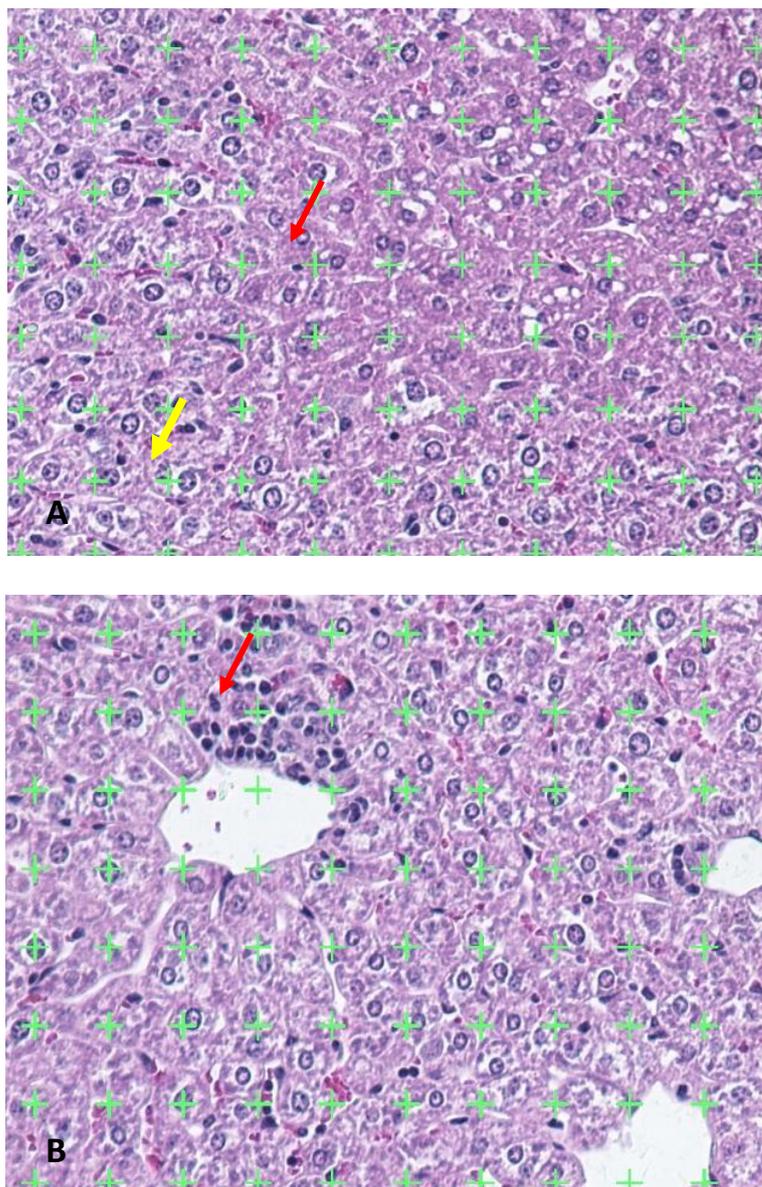
Figura 4: Glomérulos com a grade de pontos (+) do programa morfométrico ImageJ.



(A): glomérulos com a grade de pontos (+) em verde; (B, C e D): zoom da imagem A para melhor visualização das cruzes que coincidem com a matriz mesangial e com o tufo glomerular total. HE, 20X.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Figura 5: Hepatócitos com a grade de pontos (+) do programa morfométrico ImageJ.



Imagens HE, 20X com zoom: (A): seta vermelha indicando a cruz que coincidiu com um hepatócito normal para quantificar a área de hepatócitos normais; seta amarela indicando a cruz que coincidiu com um hepatócito com degeneração hidrópica para

quantificar a área de hepatócito degenerados. (B): seta vermelha indicando uma cruz que coincidiu com células inflamatórias para quantificar o infiltrado inflamatório.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

#### 4.4.2 Baço

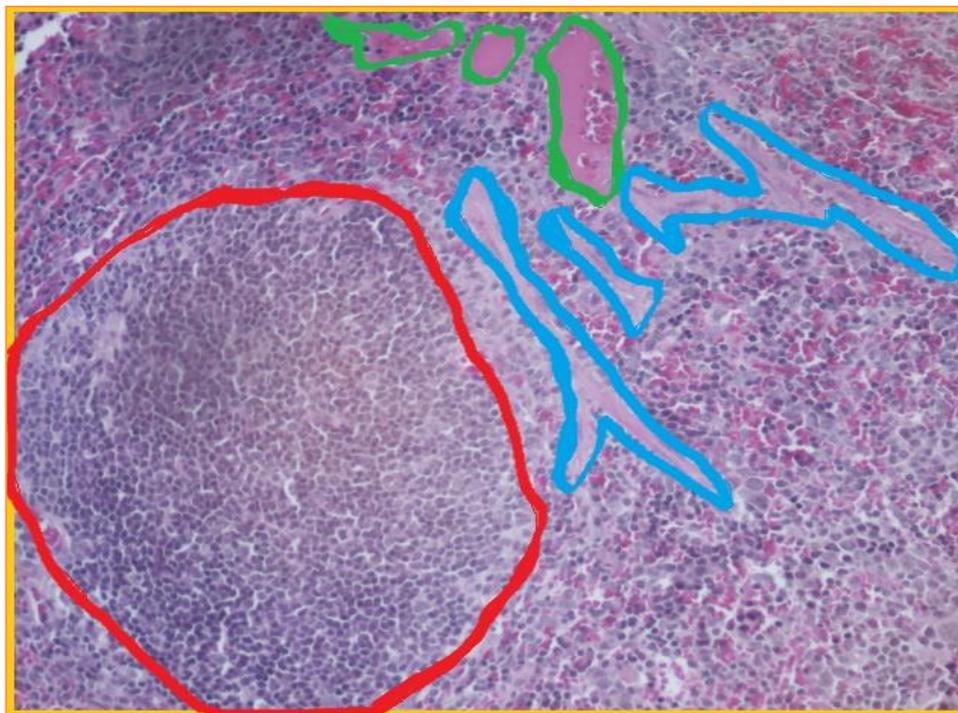
A morfometria do baço foi realizada com auxílio da ferramenta de seleção à mão livre do *software* ImageJ, na qual a região de interesse foi circundada e seu valor de área foi calculado em  $\mu\text{m}^2$  pelo *software*. Foram quantificadas as áreas das seguintes regiões: área total da imagem; cápsula; polpa branca; arteríolas; trabéculas, e; vasos. A partir da identificação dessas estruturas dentro de cada imagem (Figura 6), foram computadas as respectivas áreas e, no *software* Excel (Microsoft, USA), as seguintes medidas:

Área de polpa branca real = (área de polpa branca total) - (área de arteríolas);

Área de polpa vermelha real = (área total da imagem) - [(cápsula) - (trabéculas) - (vasos)] - ( $\Sigma$  área de polpa branca total);

Em caso de artefatos, essa área também foi descontada no cálculo da área de polpa vermelha real.

Figura 6: Regiões do baço analisadas pelo programa morfométrico ImageJ.



Área total da imagem (laranja); vasos e/ou trabéculas (azul); polpa branca (vermelho), e; arteríolas (verde). HE, 20X.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

#### **4.5 EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Para efeito de confirmação da infecção dos animais a extração de DNA dos tecidos foi realizado utilizando o Kit Relia Prep™g DNA Tissue Miniprep System (Promega, USA) conforme indicado pelo fabricante. Os primers utilizados para amplificação em PCR de 120 pb de kDNA de *Leishmania spp.* (NICOLAS, 2002) foram o were Jw11 (5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3') and Jw12 (5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3'). PCR foi realizada em um volume of 50µl, com cada reação contendo 0.2Mm dNTPs, 1µM de cada primer, 1U TaqPolimerase em tampão fornecido pelo fabricante (GoTaq, Promega, USA), and 50ngDNA. Após a fase de desnaturação inicial de 10 min a 95°C, 40 ciclos de desnaturação por 30 s a 95°C, fervura 60°C por 30s e extensão por 30s a 72°C, que foi seguido por uma extensão final a 72°C por 10 min. O produto da PCR foi visualizado em um gel de agarose 1% e coradas com GelRed® (Biotium, USA).

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

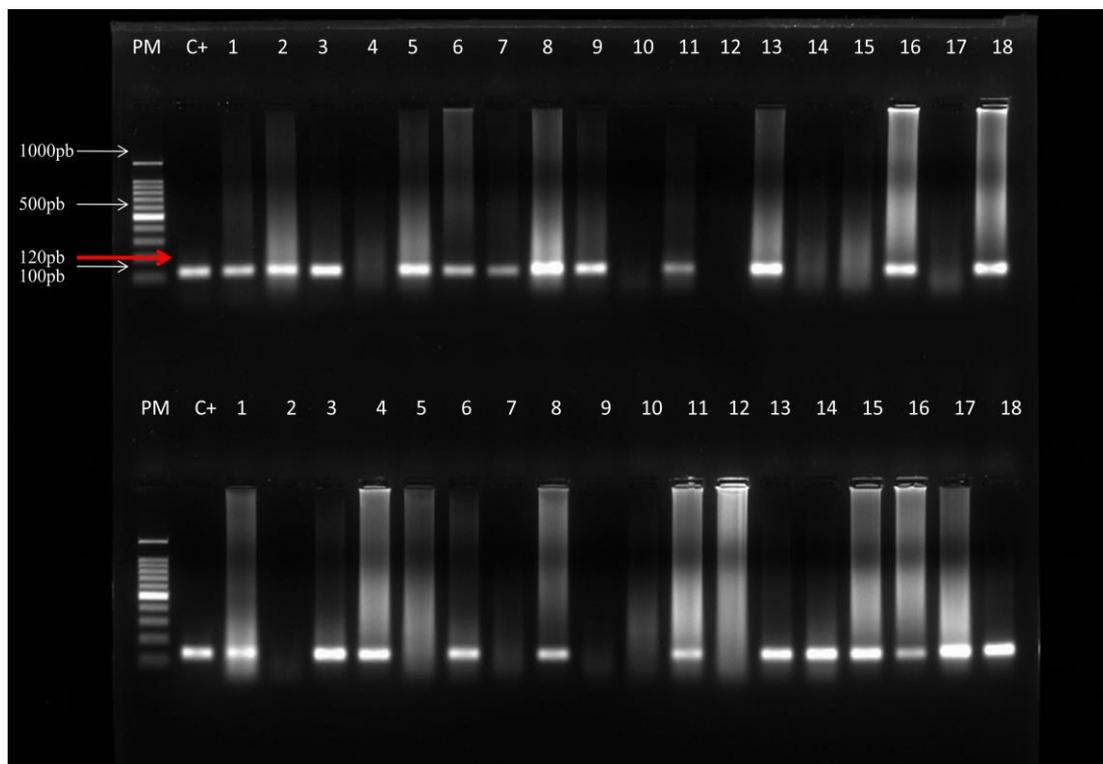
Para realizar a análise estatística foi elaborada uma planilha eletrônica (Microsoft Excel), e a análise dos dados foi feita no programa SigmaStat 4.0. As variáveis foram testadas para verificar se apresentavam distribuição normal, através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação entre dois grupos independentes foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para mais de dois grupos, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. As correlações foram feitas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da infectividade mediante PCR

Foram analisadas as amostras de tecidos de fígado e baço de 25 camundongos infectados e não infectados com *L. infantum* pelo método da PCR. Mediante este teste demonstrou-se que todos os animais foram infectados pelo parasito (Figura 7).

Figura 7. Gel representativo dos produtos da PCR dos tecidos dos camundongos positivos para *L. infantum* utilizando os *primer JW11 e JW12*.



Gel de agarose 1,5% corado com GelRed®; PM: Peso Molecular 100pb; C+: controle positivo, DNA *pellet* de cultura de *Leishmania infantum* 120pb; Numerações onde as bandas amplificaram – animais infectados positivos para PCR; Numerações onde as bandas não amplificaram – animais do grupo controle, negativos para PCR.

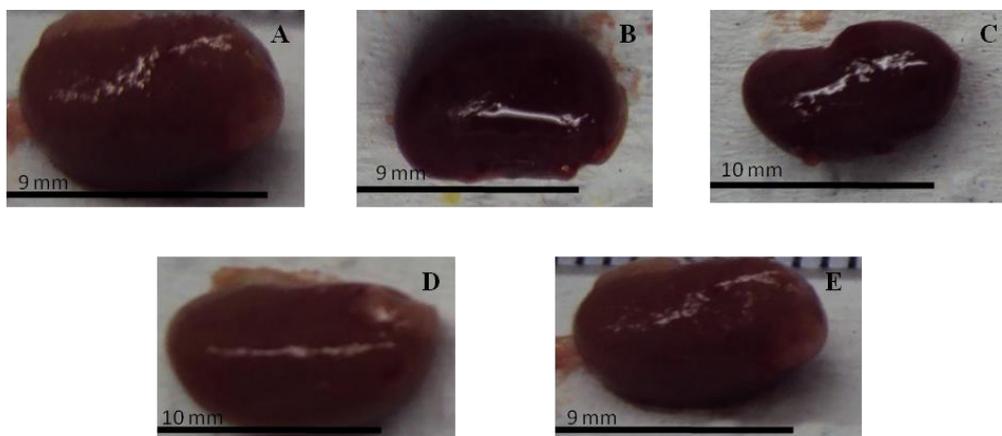
Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

### 5.2 Análise histopatológica do baço, fígado e rim

Foi realizada uma análise histopatológica geral dos fragmentos de rim, fígado e baço para identificarmos as principais lesões presentes nesses órgãos.

À análise macroscópica, não encontramos diferença entre os rins dos animais infectados e nem entre os dos animais infectados com o grupo controle (Figura 8).

Figura 8: Rim direito dos animais dos grupos: controle, L15, L30, L45 e L60.

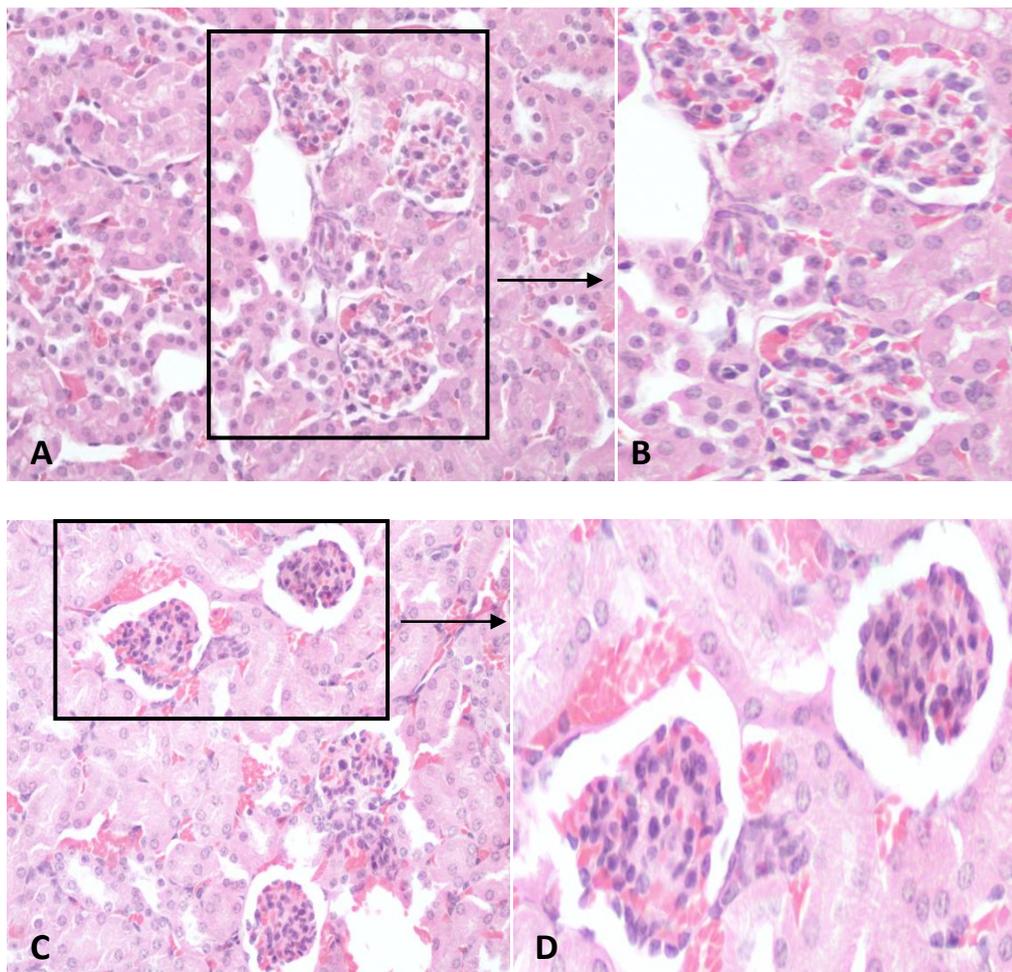


(A): Rim direito de um animal do grupo controle; (B): Rim direito de um animal do grupo L15; (C): Rim direito de um animal do grupo L30; (D): Rim direito de um animal do grupo L45; (E): Rim direito de um animal do grupo L60.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

A análise histopatológica dos glomérulos dos animais infectados mostrou aparente aumento do tufo glomerular, colabamento das alças capilares, aumento da matriz mesangial e aumento do espaço urinário. Ressalta-se que as lesões foram observadas durante todo o transcurso da infecção (15, 30, 45 e 60 dias), (Figura 9).

Figura 9. Diferença dos glomérulos entre um animal do grupo controle e um do grupo com 30 dias de infecção.

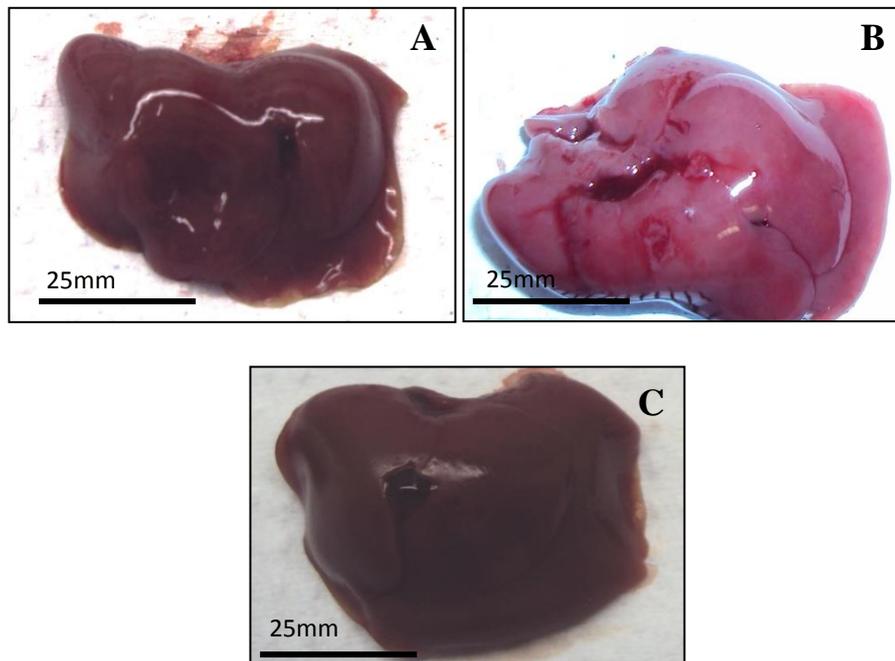


(A) Glomérulos de um camundongo do grupo controle; (B) Zoom da imagem A; (C) Glomérulos de um camundongo L30 (30 dias de infecção); (D) Zoom da imagem C. HE, 40x.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Na análise macroscópica do fígado, observamos diferença na coloração deste órgão entre os animais dos diferentes grupos experimentais. Nos animais do grupo controle, o órgão apresentou uma coloração vermelho-vinhosa em todos os animais, enquanto o fígado dos animais infectados com *Leishmania infantum* apresentou uma coloração vermelho pálida aos 15 dias (compatível com degeneração hidrópica), contudo esta foi tornando-se cada vez mais pálida a medida que transcorria a infecção, chegando a seu máximo de palidez aos 45 dias. Aos 60 dias o fígado voltou a sua coloração similar à dos controles (Figura 10).

Figura10. Fígado coletado de animal não infectado e de um animal infectado com *Leishmania infantum*.

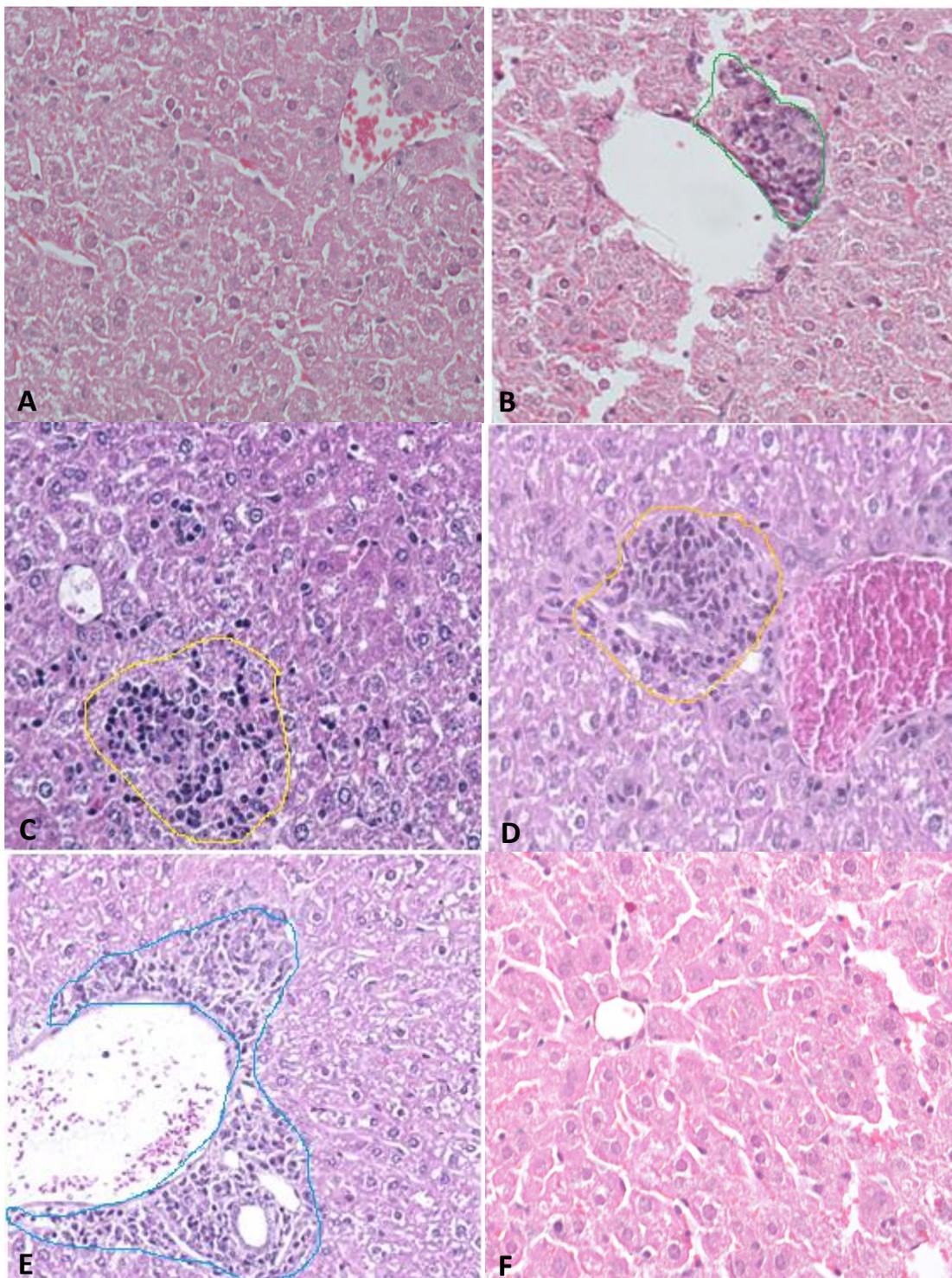


(A): Fígado de um animal do grupo controle; (B): Fígado de um animal com 45 dias de infecção; (C): Fígado de um animal com 60 dias de infecção.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Uma das lesões microscópicas do fígado observada com maior frequência neste estudo foi a degeneração hidrópica, também chamada de degeneração balonizante ou vacuolar e infiltrado inflamatório perivascular e intersticial as quais podem ser visualizadas na Figura 11. Além disso, foi possível observar também granulomas em organização ou esboço de granulomas, como pode ser observado na Figura 11.C.

Figura 11. Degeneração Hidrópica e infiltrado inflamatório no fígado de camundongos infectados com *Leishmania infantum*.



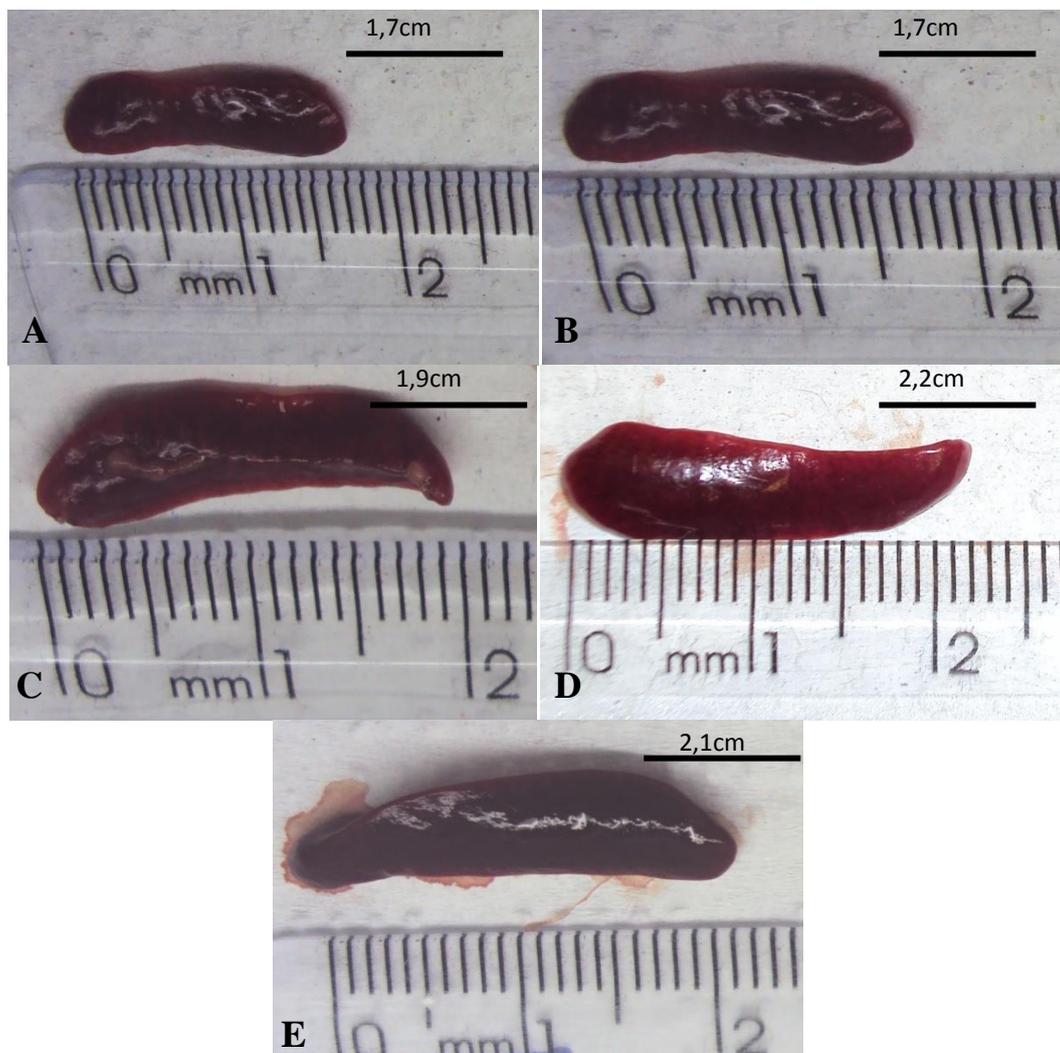
(A) Hepatócitos com degeneração hidrópica de um camundongo do grupo L15 (15 dias de infecção); (B) Hepatócitos com degeneração hidrópica de um camundongo do grupo L30 (30 dias de infecção) e infiltrado inflamatório perivascular (verde); (B) Hepatócitos com degeneração hidrópica de um camundongo do grupo L30 (30 dias de infecção) e infiltrado inflamatório intersticial (amarelo); (D) Hepatócitos com degeneração hidrópica de um camundongo do grupo L45 (45 dias de infecção) e infiltrado

inflamatório perivascular (laranja); (E) Hepatócitos com degeneração hidrópica de um camundongo do grupo L60 (60 dias de infecção) e infiltrado inflamatório perivascular (azul); (F) Hepatócitos predominantemente normais de um camundongo do grupo controle.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

No baço, a única alteração macroscópica visivelmente notada foi o seu tamanho, menor nos animais do grupo controle e um aumento considerável nos animais dos grupos com infecção (L15, L30, L45 e L60) (Figura 12). Este aumento começou a ser observado aos 30 dias ressaltando-se que aos 60 dias não se encontrou diferença com os animais eutanasiados aos 45 dias.

Figura 12: Baço dos animais dos grupos: controle, L15, L30, L45 e L60.

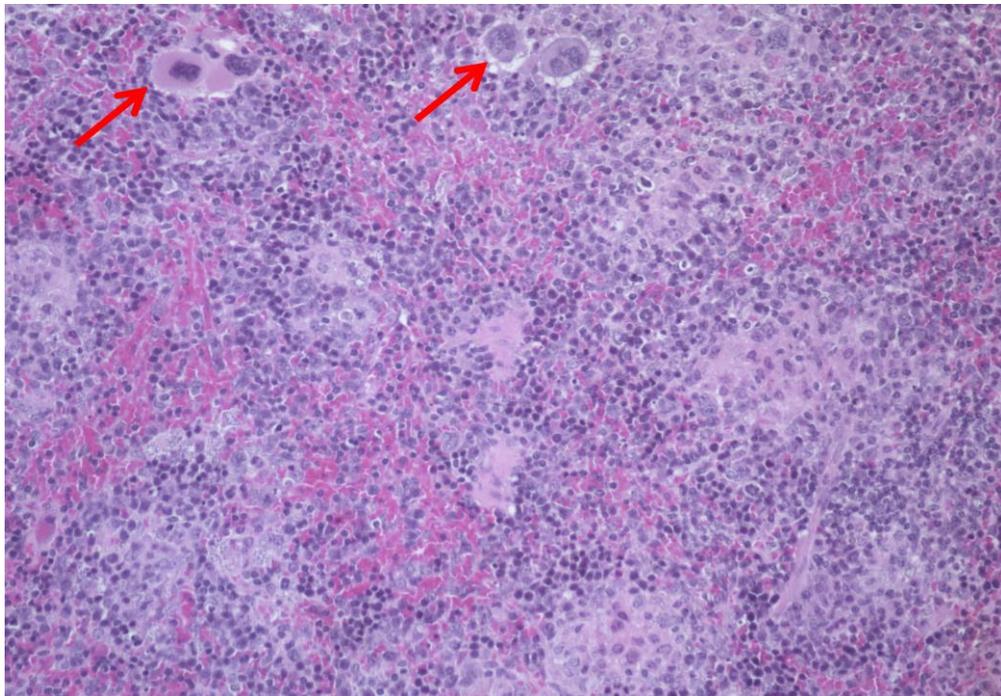


(A): Baço de um animal do grupo controle medindo 1,7 cm. (B): Baço de um animal do grupo L15 medindo 1,7 cm. (C): Baço de um animal do grupo L30 medindo 1,9 cm. (D): Baço de um animal do grupo L45 medindo 2,2 cm. (E): Baço de um animal do grupo L60 medindo 2,1 cm.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Um achado ao exame microscópio de luz comum, foi a presença das células de Mott nos animais do grupo com 60 dias de infecção (Figura 13).

Figura 13. Células de Mott presentes do baço de camundongos infectados por *Leishmania infantum*.



Células de Mott indicadas pelas setas vermelhas presentes nos camundongos infectados do grupo L60.

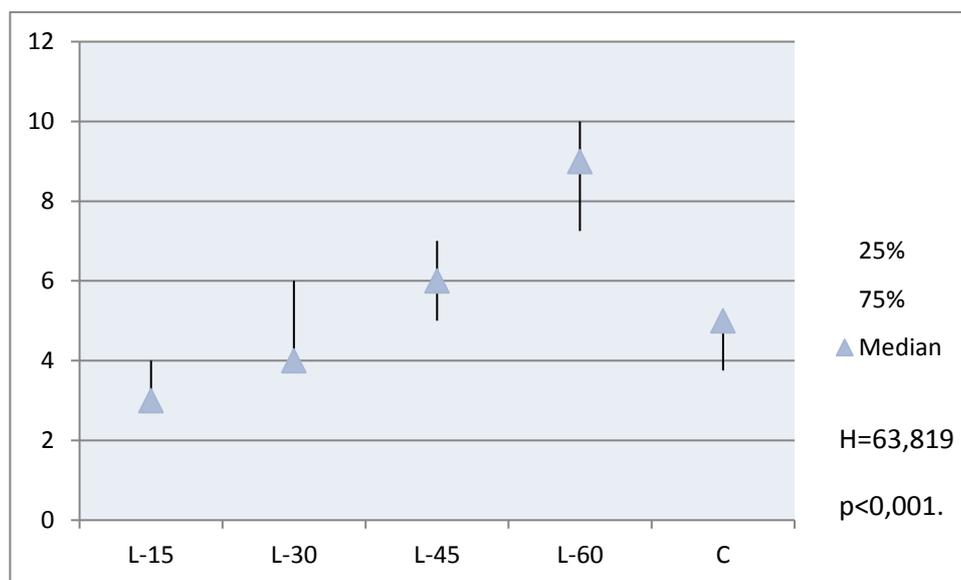
Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

### 5.3 Análise Morfométrica

#### 5.3.1 Rim

Na morfometria da área da matriz mesangial, o grupo L15 apresentou mediana 3,0 (3,0 – 4,0), L30 mediana 4,0 (4,0 -6,0), L45 mediana 6,0 (5,0 – 7,0), L60 mediana 9,0 (7,250 – 10,000) e o grupo controle apresentou mediana 5,0 (3,750 – 5,000) (Figura 14). Houve diferença significativa entre L60 e L15, L30 e controle; e entre L45 e L15.

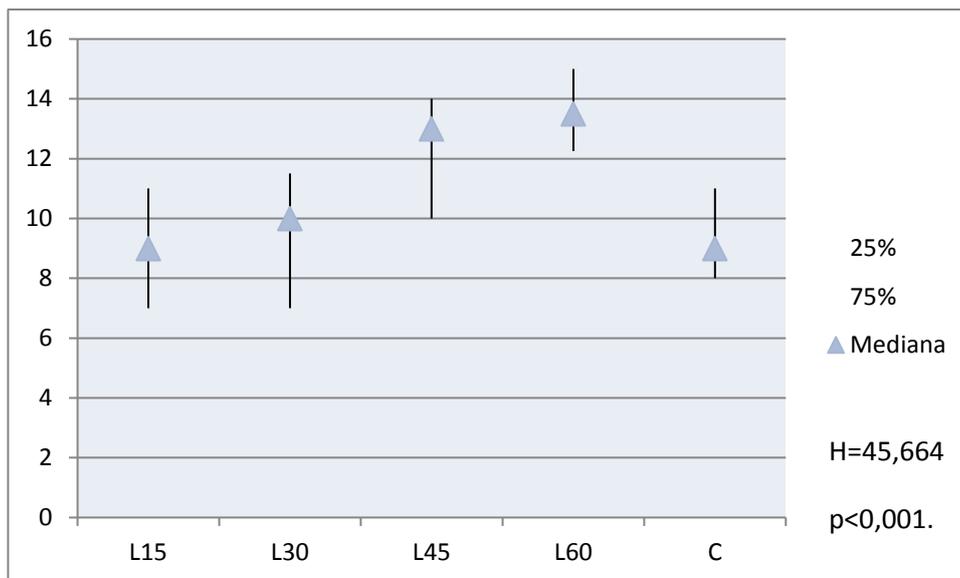
Figura 14. Comparação das medianas das áreas de matriz mesangial.



Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Na morfometria da área total do tufo glomerular o grupo L15 apresentou mediana 9,0 (7,0 – 11,0), L30 mediana 10,0 (7,0 - 11,5), L45 mediana 13,0 (10,0 – 14,0), L60 mediana 13,5 (12,25 – 15,00) e o grupo controle apresentou mediana 9,0 (8,0– 11,0) (Figura 15). Houve diferença significativa entre L60 e L15; L30 e controle; e entre L45 e L15, L30 e controle.

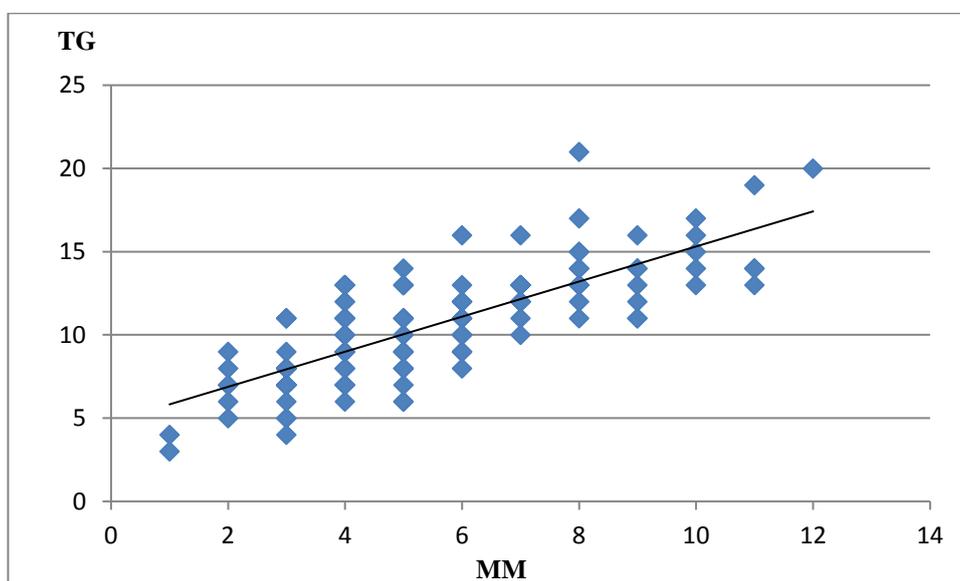
Figura 15. Comparação das medianas das áreas do tufo glomerular.



Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Após medir as áreas do tufo glomerular e da matriz mesangial, foi feita uma correlação entre estas e foi obtido um coeficiente de correlação ( $r=0,780$ ) e  $p<0,000000200138$  (Figura 16).

Figura 16: Correlação entre das áreas de matriz mesangial (MM) e tufo glomerular (TG).

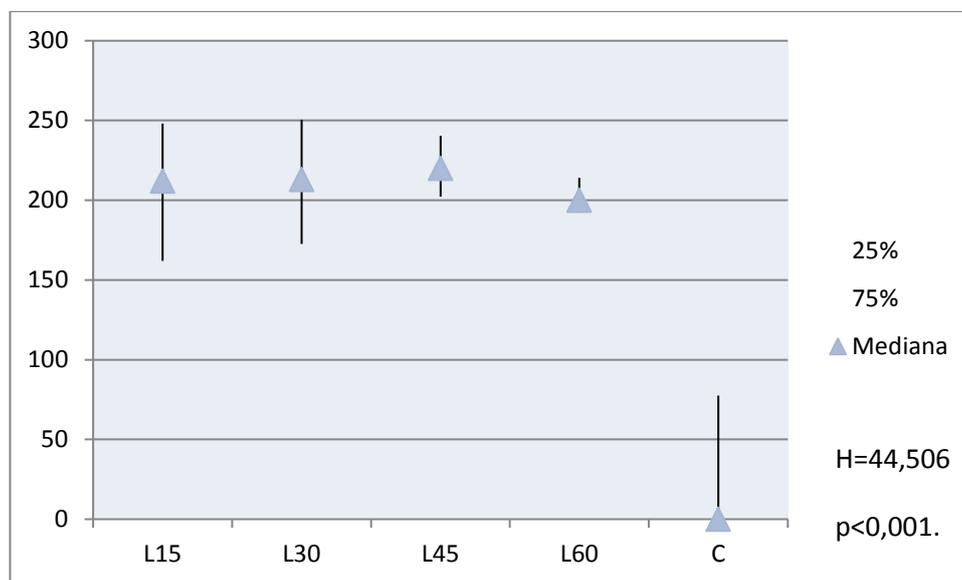


Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

### 5.3.2 Fígado

Na análise da área de degeneração hidrópica presente no tecido hepático, o grupo L15 apresentou mediana 212,0 (162,0 – 248,0), L30 mediana 213,0 (172,5 - 250,5), L45 mediana 220,0 (202,25 – 240,50), L60 mediana 200,0 (195,25 – 214,00) e o grupo controle apresentou mediana 0,0 (0,0 – 77,5) (Figura 17). Apenas houve diferença significativa entre L15, L30, L45 e L60 com o grupo controle.

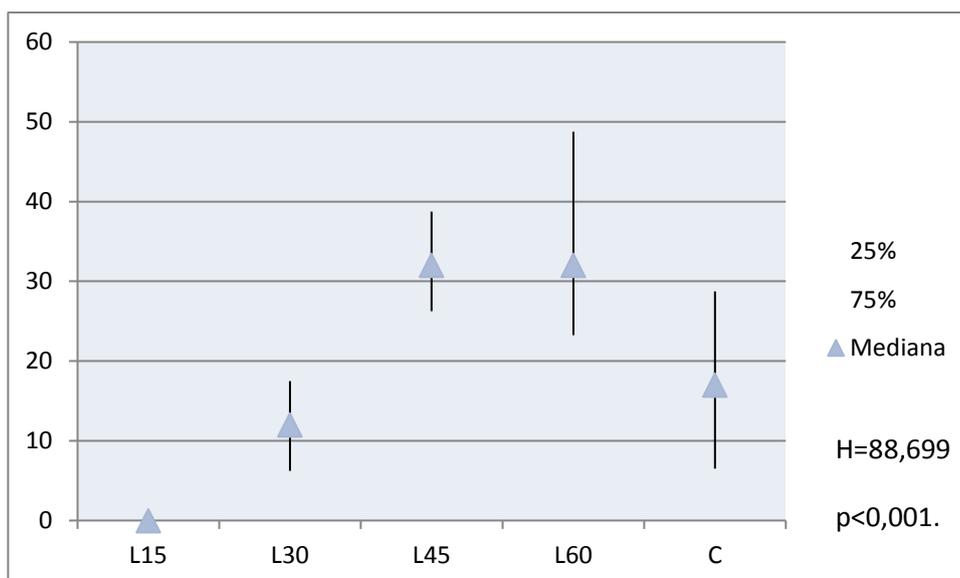
Figura 17: Comparação das medianas das áreas de degeneração hidrópica no fígado.



Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Na análise da área de inflamação presente no tecido hepático, o grupo L15 apresentou mediana 0,0 (0,0 – 0,0), L30 mediana 12,0 (6,25 - 17,50), L45 mediana 32,0 (26,25 – 38,75), L60 mediana 32,0 (23,25 – 48,75) e o grupo controle apresentou mediana 17,0 (6,50 – 28,75) (Figura 18). Houve diferença significativa entre L45 com os grupos L15, L30 e grupo controle; L60 com os grupos L15; grupo controle com o grupo L15; grupo L30 com grupo L15.

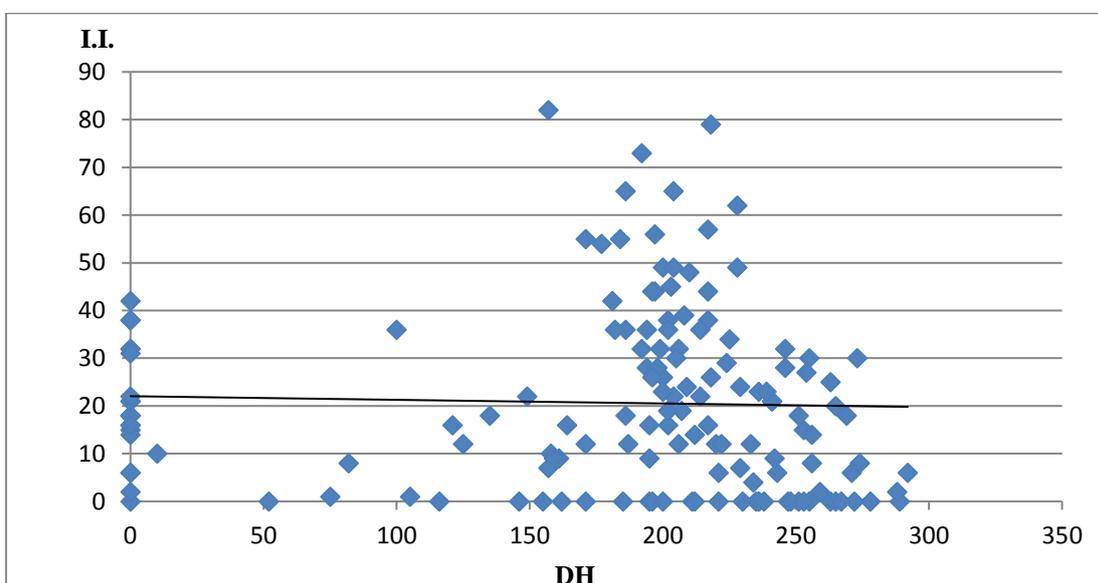
Figura 18. Comparação das medianas das áreas de infiltrado inflamatório no fígado.



Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Após medir as áreas de hepatócitos com degeneração hidrópica e de inflamação, foi feita uma correlação entre estas e foi obtido um coeficiente de correlação ( $r=-0,175$ ) e  $p<0,0342147$ ; (Figura 19).

Figura 19. Correlação entre as áreas de degeneração hidrópica (DH) e infiltrado inflamatório (II) no fígado.

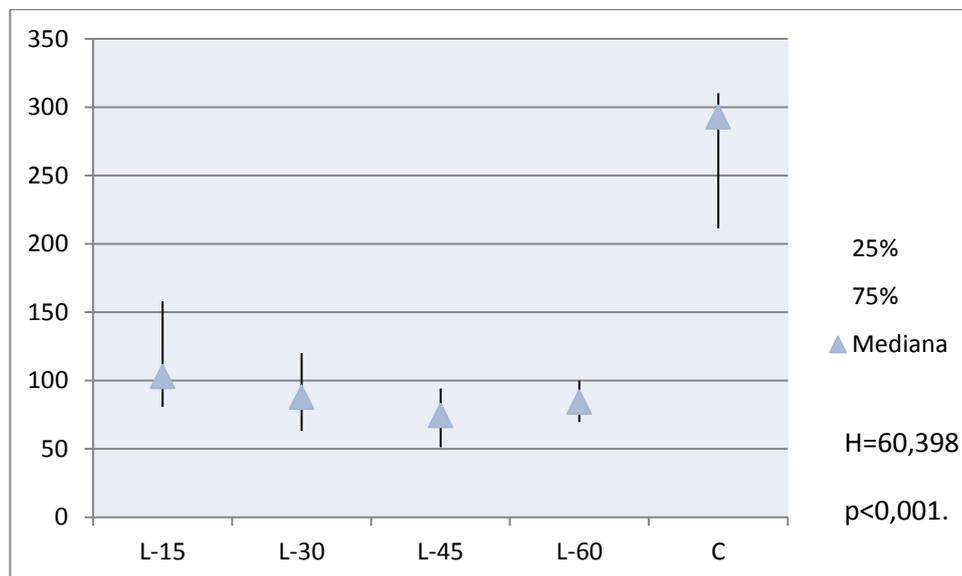


Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Na análise da área de hepatócitos normais, o grupo L15 apresentou mediana 103,0 (81,0 – 158,0), L30 mediana 88,0 (63,25 - 120,25), L45 mediana 74,5 (51,25 – 94,25), L60 mediana 84,5 (69,75 – 100,00) e o grupo controle apresentou mediana

293,0 (211,5 – 310,25) (Gráfico (Figura 20). Houve diferença significativa entre o grupo controle com os grupos L45, L60, L30 e L15; e entre os grupos L15 e L45.

Figura 20. Comparação das medianas das áreas de hepatócitos normais.



Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

### 5.3.3 Baço

No baço foram quantificadas as áreas de polpa vermelha e polpa branca. Na análise da área de polpa branca obtiveram-se os valores de mediana para os grupos de acordo com a tabela abaixo:

Quadro 1. Comparação da mediana da área de polpa branca do baço entre os grupos com 15 dias de infecção (L15), 30 dias de infecção (L30), 45 dias de infecção (L45), 60 dias de infecção (L60) e grupo controle (C).

GRUPO	25%(1°QUARTIL)x10 <sup>-3</sup>	75%(3°QUARTIL)x10 <sup>-3</sup>	MEDIANA (x10 <sup>-3</sup> )
L15	1511709312	3007147008	2599010304
L30	1198490002	3227996740	2097597536
L45	1328276232	2190958592	1955975776
L60	1124253808	1818170976	1574102464
C	958040694	2840879312	1895967648

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Houve diferença significativa entre o grupo com 15 dias de infecção (L15) e o grupo com 60 dias de infecção (L60); (H= 11,121; p< 0,05).

Na análise da área de polpa vermelha obtivemos os valores de mediana para os grupos de acordo com a tabela abaixo:

Quadro 2. Comparação da mediana da área de polpa vermelha do baço entre os grupos com 15 dias de infecção (L15), 30 dias de infecção (L30), 45 dias de infecção (L45), 60 dias de infecção (L60) e grupo controle (C).

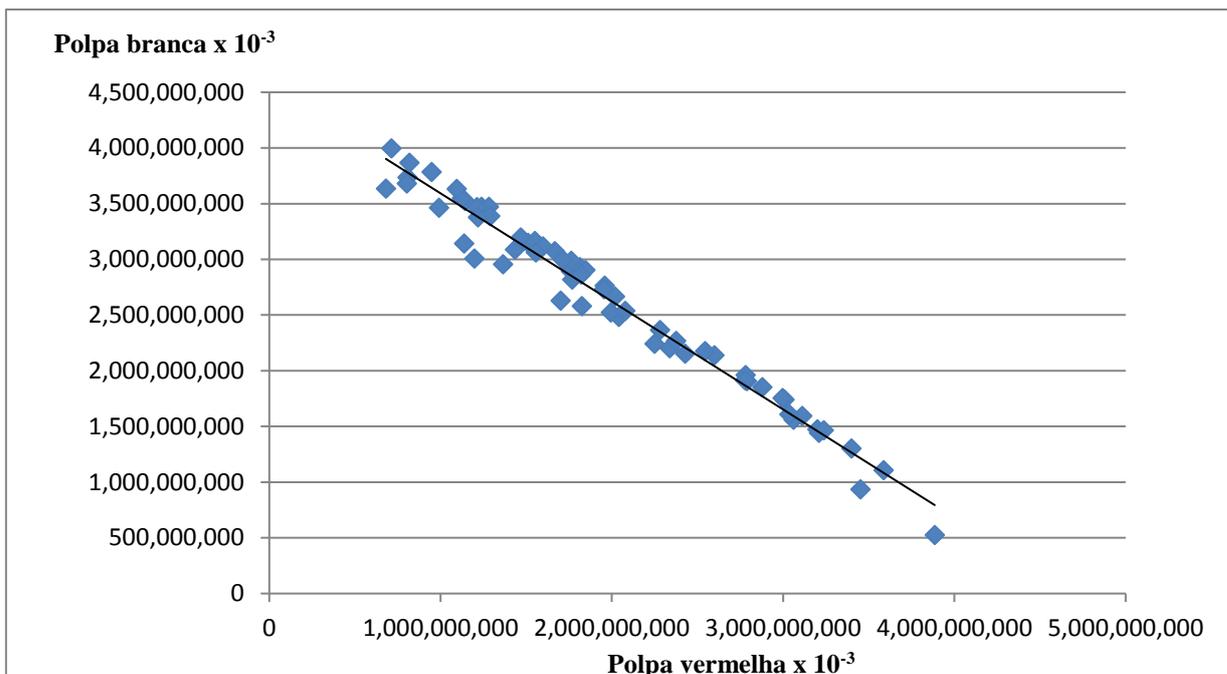
GRUPO	25%(1°QUARTIL)x10 <sup>-3</sup>	75%(3°QUARTIL)x10 <sup>-3</sup>	MEDIANA(x10 <sup>-3</sup> )
L15	1741589896	3007579924	2140458929
L30	1469004274	3097470818	2498340551
L45	2313932197	3402580436	2748483238
L60	2911788150	3571688692	3142089398
C	1883848362	3593553936	2768216903

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Não houve diferença significativa entre os grupos (H= 7,543; p< 0,110).

Após medir as áreas de polpa vermelha e polpa branca, foi feita uma correlação entre estas e foi obtido um coeficiente de correlação (r=-0,982) e p<0,00000020063 (Figura 21).

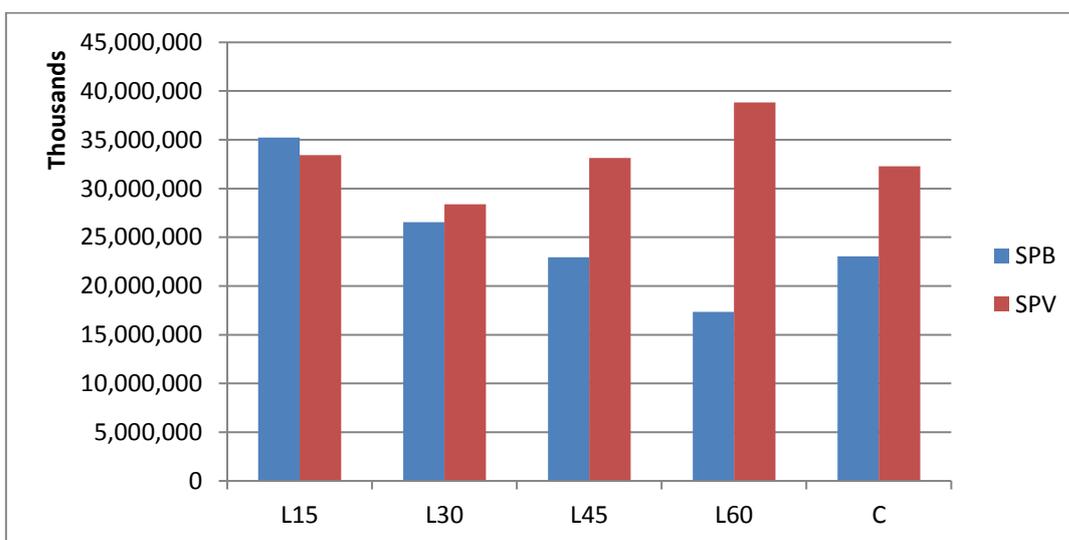
Figura 21. Correlação entre as áreas de polpa branca e polpa vermelha.



Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Quando realizamos o somatório das áreas de polpa branca e polpa vermelha de todos os animais pertencentes a cada grupo podemos observar que o grupo que apresenta a menor área de polpa branca é o L60 e, também possui a maior área de polpa vermelha. O grupo que possui a maior área de polpa branca é o L15, porém, o grupo que apresenta a menor área de polpa vermelha é o L45 (Figura 22).

Figura 22: somatório das áreas de polpa branca e polpa vermelha de cada um dos grupos.

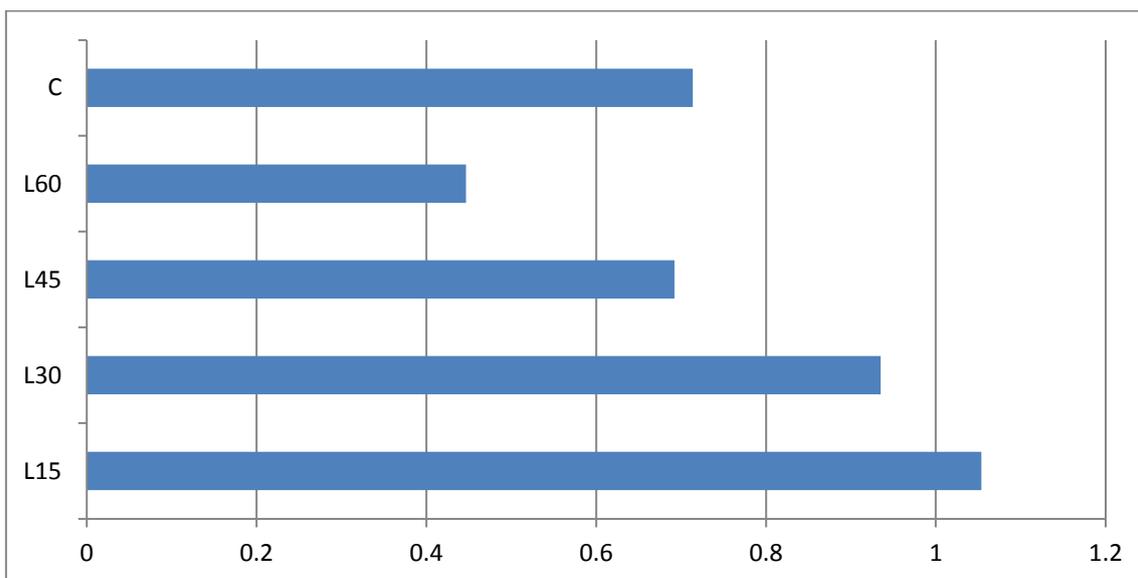


Valores de Polpa branca e Polpa vermelha x10<sup>-3</sup>.

Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

Analisando a razão entre a polpa branca e a polpa vermelha, obtivemos que os seguintes valores de razão para os grupos: L15 (1,05); L30 (0,94); L45 (0,69); L60 (0,45) e C (0,71) de acordo com o gráfico abaixo (Figura 23):

Figura 23: razão entre as áreas de polpa branca e a polpa vermelha de cada um dos grupos.



Fonte: elaborado pelo autor, 2016.

## 6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave responsável por um alto grau de morbidade e mortalidade em hospedeiros mamíferos. É caracterizada pela infiltração de formas amastigotas em órgãos-alvo, tais como fígado, baço, medula óssea, linfonodos, Placas de Payer dos hospedeiros. No entanto, os estudos tem tido como foco apenas o diagnóstico parasitológico, a resposta imunológica do hospedeiro vertebrado para o possível desenvolvimento de vacinas não dando enfoque principalmente para a mensuração das lesões produzidas pelo parasito em outros órgãos (MELBY et al, 2000). Embora a leishmaniose visceral canina (LVC) seja conhecida como uma doença sistêmica grave, existem poucos estudos descrevendo as características histopatológicas dos diferentes tecidos do hospedeiro parasitado (GIUNCHETTI et al, 2006).

Vários modelos animais experimentais de LV foram desenvolvidos ao longo dos anos (ABREU-SILVA et al. 2003; CARRIÓN et al. 2006; GARCIA-ALONSO et al. 1996). O modelo experimental murino para infecção por *Leishmania infantum* possui muitas das características semelhantes às vistas no curso da infecção humana, sendo que o hamster é o melhor animal para observá-las (HOMMEL et al, 1995; MELBY et al, 2001; PACIELLO et al, 2010). Porém, devido às dificuldades apresentadas para manuseio do animal, por não se encontrar reagentes suficientes para trabalhar experimentalmente, se tornou um modelo difícil de ser utilizado nas pesquisas. Dessa forma, a maioria dos pesquisadores optou por usar o camundongo BALB/c como modelo experimental para estudos de vacinas, bem como para investigar patogênese da doença de LV (CARRION et al, 2006; STANLEY e ENGWERDA, 2007; MURRAY, 2001; AHMED et al, 2003; RAVINDRAN et al, 2010).

Neste estudo fizemos uma análise histopatológica geral dos fragmentos de fígado, baço e rim para identificarmos as principais lesões presentes nesses órgãos e, em seguida, estas foram quantificadas através de morfometria. Além disso, analisamos os tecidos mediante a procura de DNA pela PCR específica com o objetivo de comprovar se os animais tinham-se infectado com *L. infantum*.

O cinetoplasto é uma organela presente nos kinetoplastídeos, formada por cerca de 10.000 minicírculos de DNA (kDNA), com 600 a 800 pb nos membros do gênero *Leishmania* (RODRIGUEZ et al., 2002). Foi sugerido por Rodgers et al. (1990) a possibilidade de amplificação do fragmento da região conservada do kDNA, adotando “primers” específicos, contendo 120 pb, a partir de um único parasita presente na

amostra, sendo a amplificação da região conservada 10 vezes mais sensível do que a região variável. Dessa forma, desenvolveu-se um diagnóstico molecular baseado na amplificação feita por “primers” anelados na região alvo do kDNA de cepas de *Leishmania* spp. pela PCR, que tem sido muito utilizado em diversos estudos (FISA et al., 2001; GOMES et al., 2007; IKONOMOPOULOS et al., 2003; LACHAUD et al., 2002; MANNA et al., 2004; NUNES et al., 2007). Em nosso trabalho foram analisadas as amostras de tecidos de fígado e baço de 25 camundongos infectados e não infectados com *L. infantum* pelo método da PCR. Mediante este teste demonstrou-se que todos os animais infectados pela referida cepa foram positivos e os animais do grupo controle foram negativos, como esperado.

De modo geral, no baço, fígado e rins, as alterações histológicas caracterizam-se por infiltrado linfoplasmocitário acentuado associado à presença de macrófagos parasitados (COSTA et al, 2000; SANTOS et al, 2004; SOLANO-GALLEGO et al, 2004; GIUNCHETTI et al, 2008).

Ao exame macroscópico, não foram identificadas alterações renais entre os grupos de animais infectados e nem entre eles com o grupo controle. Ao exame microscópico foi observado nos glomérulos um possível aumento no depósito de matriz mesangial e, quando quantificamos esta área observamos um aumento significativo da mesma ao longo do curso da infecção (quanto maior o tempo de infecção, maior a área de matriz mesangial), comprovando este achado histopatológico. Foi quantificada também a área total do tufo glomerular e pôde-se verificar um aumento dessa área em todo o curso da infecção, comportando-se de uma maneira muito similar ao observado com a matriz mesangial. A correlação entre estas áreas foi positiva ( $r=0,780$ ) e ( $p<0,000000200138$ ) indicando que quanto maior a área de matriz mesangial, maior a área do tufo glomerular. Essas alterações associadas a outros achados histopatológicos, como o colapamento de alças capilares, sugerem uma possível glomerulonefrite membranoproliferativa, como observado no estudo realizado por Costa et al, 2003.

Neste estudo observamos um aumento de baço e fígado (hepatoesplenomegalia) nos animais infectados. Segundo Liese et al (2008) a inoculação endovenosa de *L. infantum* provoca um aumento do baço e do fígado resultante da massiva carga parasitária nestes órgãos, o que corrobora os nossos resultados.

Foram observadas alterações macroscópicas no fígado quanto à diferença na coloração do órgão nos diferentes grupos experimentais. Nos animais do grupo controle, o órgão apresentou cor vermelho-escuro, coloração esta que sugere um fígado normal.

O fígado dos animais infectados com *Leishmania infantum* apresentou uma coloração pálida a partir do 15º dia de infecção, permanecendo até ao 45º dia onde começou a retomar a sua coloração normal e, ao 60º dia quase já não se apresentava pálido. Segundo Pereira, 2006, essa palidez pode estar relacionada com o quadro de degeneração hidrópica encontrado nos grupos de animais infectados, a qual foi observada com frequência neste estudo. Também chamada de degeneração balonizante ou vacuolar, a degeneração hidrópica é caracterizada pelo acúmulo citoplasmático de água e eletrólitos, deixando as células com citoplasma claro à coloração histológica, com aspecto granuloso e alteração da proporção citoplasma/núcleo. Esta alteração, em estágios avançados, provoca compressão dos capilares sinusóides deixando-os pouco visíveis e dificultando a circulação sanguínea. Esse fenômeno é caracterizado por citoplasma claro e aumento do volume dos hepatócitos (LAW e BRUNT, 2010).

Neste estudo foram observados nos animais infectados infiltrados inflamatórios no espaço porta e no interstício de maneira evidente. Vistas essas alterações, foram quantificadas as áreas de degeneração hidrópica e inflamação e, posteriormente, realizada uma correlação entre estas, uma vez que, as principais alterações apresentadas nos grupos de animais infectados foram a degeneração hidrópica e focos inflamatórios perivascular, mais frequentemente no espaço porta e, focos intersticiais.

Quando quantificamos a área de hepatócitos degenerados em nosso estudo, vimos uma diferença significativa entre os grupos de animais infectados (L15, L30, L45 e L60) com os animais do grupo controle ( $H=44,506$ ;  $p<0,001$ ) concluindo, portanto, que os animais infectados apresentaram uma área maior de hepatócitos degenerados que o grupo controle. Domingues *et al.* (2009) detectaram degeneração hidrópica no fígado de ratas *Wistar* submetidas à desnutrição. Melo *et al.* (2008), ao analisar o fígado de cães naturalmente infectados com *L.chagasi*, também observaram a presença de degeneração hidrópica neste órgão. El Hage *et al.* (1994) analisaram histologicamente o fígado de pacientes com diagnóstico confirmado de LV e a degeneração hidrópica estava presente na maioria dos casos, podendo-se inferir que a degeneração hidrópica é um tipo de lesão presente em humanos e que é semelhante em modelos experimentais, o que facilita a realização de estudos mais aprofundados sobre a mesma.

Quanto à inflamação, encontramos diferença significativa entre L45 com os grupos L15, L30 e grupo controle; L60 com os grupos L15, L30 e grupo controle; grupo controle com o grupo L15; grupo L30 com grupo L15 ( $H=88,699$ ;  $p<0,001$ ). Contudo, o grupo controle também apresentou infiltrado inflamatório, o que, nesse caso, não está

relacionado ao processo infeccioso produzido pela *Leishmania infantum*, uma vez que os mesmos foram negativos na PCR. Já os animais infectados iniciam a formação de focos inflamatórios com 30 dias após a infecção e, com o passar do tempo podemos notar um aumento destes focos inflamatórios até a formação de granulomas. Durante o curso da infecção por *Leishmania infantum* formas promastigotas dos parasitos são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção. Estes quando infectados, passam então a secretar quimiocinas para o recrutamento de mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção (BACELAR e CARVALHO, 2005). A formação de granulomas ocorre após a introdução dos parasitos na corrente sanguínea, sendo esses sequestrados pelos macrófagos do baço e do fígado. No fígado, as células de Kupffer fagocitam os microorganismos, mas apesar de suas propriedades endocíticas e secretórias, há uma falha na produção de intermediários reativos de oxigênio, um de seus principais mecanismos antimicrobianos. Em consequência formas amastigotas se multiplicam e concomitantemente ocorre a agregação de células de Kupffer para formar o núcleo dos granulomas (LEPAY et al, 1985; MURRAY et al, 1985). Giunchettiet *al.*, 2008 em um estudo com cães com LV observaram esse processo inflamatório nos animais o que também já havia sido evidenciado em um estudo com humanos por El Haget *et al*, em 1994. Após correlacionar a mediana dessas duas áreas mensuradas, obtivemos uma correlação negativa ( $r=-0,175$ ;  $p<0,0342147$ ) podendo-se inferir que quanto maior a área de hepatócitos com degeneração hidrópica menor a área de inflamação tecidual e vice-versa.

No estudo do baço, a única alteração macroscópica visível foi o seu tamanho, em que percebemos um aumento considerável no órgão (esplenomegalia) dos animais infectados a partir do 30º dia e este processo se estabilizou no 45º dia de infecção, permanecendo de igual tamanho aos 60 em todos do grupo L-60. Outros estudos indicam que o baço, órgão onde se inicia a resposta imune mediada por células, também parece ser o local de persistência do parasito com consequentes modificações imunopatológicas. Dentre estas: esplenomegalia e distúrbios na arquitetura tecidual que parecem contribuir para o estado de imunocompetência do hospedeiro (STANLEY E ENGWERDA,2007; LIMA et al., 2007).

Foi observado também em nosso experimento um aumento no número de leucócitos presentes na polpa branca e, por isso, foram quantificadas as áreas de polpa branca ocupada por nódulos e folículos linfóides e polpa vermelha. Posteriormente,

realizou-se a correlação entre estas. Após quantificar a área de polpa branca e comparar a mediana desta entre os grupos, observamos que houve uma diminuição ao longo do tempo de infecção. Animais com 15 dias de infecção (grupo L15) mostraram a maior área de polpa branca (Mediana= $2599010304 \times 10^{-3}$ ), enquanto que animais com 60 dias de infecção (grupo L60) mostraram a menor área (Mediana= $1574102464 \times 10^{-3}$ ) de polpa branca ( $H= 11,121$ ;  $p < 0,05$ ). Estudos realizados por Xavier *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2008 também demonstraram uma diminuição de polpa branca em animais infectados por *Leishmania infantum*. Quando quantificamos a área de polpa vermelha e comparamos a mediana desta entre os grupos infectados e, entre os grupos infectados com o grupo controle, não houve diferença significativa entre os grupos ( $H= 7,543$ ;  $p < 0,110$ ). Contudo, apesar de não haver diferença significativa, a polpa vermelha dos animais infectados aumentou durante o curso da infecção. A correlação entre estas áreas mensuradas foi negativa ( $r=-0,982$ ) e  $p < 0,00000020063$ , indicando que quanto maior a área de polpa vermelha menor a área de polpa branca ou vice-versa. De acordo com os dados do somatório das polpas, observamos um aumento da polpa branca dos animais infectados do grupo L15 quando comparada com a polpa branca do grupo controle, o que sugere realmente o início da infecção e o hospedeiro tentando combater a mesma. Após esse período de infecção ocorre uma diminuição dessa polpa podendo ser notada essa diferença a partir do 30º de infecção, porém, ainda maior que a polpa branca do grupo controle. Aos 45 dias de infecção, somatório da polpa branca é semelhante à do grupo controle. Aos 60 dias de infecção o valor do somatório de polpa branca torna-se menor e a polpa vermelha torna-se maior que o do grupo controle. Esses dados corroboram com os dados de comparação das medianas de polpa branca e polpa vermelha, pois houve diferença significativa apenas entre os grupos L15 e L60 quando a mediana de polpa branca foi comparada entre os grupos, pois houve uma diminuição considerável da polpa branca entre os grupos de animais infectados, o que parece contribuir para o estado de imunocompetência do hospedeiro, como já elucidado acima (STANLEY E ENGWERDA, 2007; LIMA *et al.*, 2007). A hiperplasia da polpa vermelha ocorre pela proliferação de macrófagos, às vezes formando agregados ou nódulos celulares intensamente parasitados (GENARO, 1993; TAFURI *et al.*, 1996). Pode-se inferir ainda que as áreas das polpas no grupo de animais infectados L60 não são proporcionais pois tiveram uma razão de 0,45; já o grupo L15 apresentou a maior razão entre as polpas o que significa que estas estão proporcionais, o que pode significar que o processo inflamatório aumentou ao longo da infecção.

As células de Mott presentes no grupo de animais com 60 dias de infecção foi um achado frequente nas amostras estudadas no presente trabalho. De maneira similar, em estudos anteriores, células de Mott foram visíveis em exames citológicos de medula óssea e linfonodos de cães com LV (ANOSA E IDOWU, 1983; YAMAGUCHI et al, 1983; BURACCO et al, 1997; GOPEGUI et al, 2004; MYLONAKIS et al, 2005). As células de Mott são plasmócitos com inclusões intracitoplasmáticas de imunoglobulinas, denominadas corpúsculos de Russel, que resultam de distensões das cisternas do retículo endoplasmático rugoso devido a um bloqueio na via secretória das imunoglobulinas (ALANEN et al, 1985). Segundo Ikeda-Garcia et al, 2008, estas células podem ocorrer no curso da LVC, indicando estimulação antigênica constante. As células de Mott no baço, portanto, constituem um achado que implica em estímulo antigênico constante, culminando numa resposta imune humoral desregulada, com alteração nas vias de secreção de imunoglobulinas pelos plasmócitos.

Diante do exposto, vimos que a infecção experimental por *Leishmania infantum* em camundongos Balb/c produziu lesões nos órgãos estudados considerados alvo (baço e fígado) e não alvo (rim) nos diferentes períodos de infecção estudados (15, 30, 45 e 60 dias de infecção) as quais pudemos demonstrá-las e quantificá-las. Algumas lesões persistiram durante todo o curso de infecção (60 dias) como, por exemplo, a degeneração hidrópica e o infiltrado inflamatório presente no fígado, a esplenomegalia, o aumento de matriz mesangial nos glomérulos renais, os quais mostraram uma progressão com o aumento do processo infeccioso. Foram encontrados achados característicos em períodos determinados da infecção como foi o caso das células de Mott presente no baço dos animais com 60 dias de infecção. Isto nos pode indicar que estudos histopatológicos sobre as lesões produzidas na LV são importantes e necessários para melhores esclarecimentos e permitir novas alternativas de tratamento na Leishmaniose Visceral.

## 7. CONCLUSÃO

Ao analisar as características morfológicas e morfométricas do fígado, baço, e rim de camundongos Balb/c isogênicos com 15, 30, 45 e 60 dias de infecção experimental com *Leishmania infantum*, podemos concluir que os animais infectados apresentaram hepatoesplenomegalia, aumento de matriz mesangial e do tufo glomerular, diminuição da polpa branca e aumento da polpa vermelha no baço, degeneração hidrópica acompanhada de infiltrado inflamatório tanto intersticial quanto perivascular no fígado, o que não aconteceu com os animais do grupo controle, pois nestes não havia presença de infecção. Portanto, é muito provável que estas alterações sejam decorrentes do processo inflamatório produzido nos diferentes períodos ao longo do curso da Leishmaniose Visceral, As lesões produzidas nesse modelo são muito similares às que acontecem em humano, permitindo assim, estudos para novas alternativas de tratamento.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol.* 77 (4): 557-561, 1991.
- ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; TEDESCO, R.C.; MORTARA, R.A.; COSTA, S.C.G. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg* 68:661–665, 2003.
- AFRIN, F.; ANAM, K.; ALI, N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigotes antigens in negatively charged liposomes. *J Parasitol* 89:730–735, 2000.
- AGUIAR, G.L.M.; BARRETO, J.H.P.M.; MORAIS, L.R.; DA SILVA FILHO, A.R. Anatomic study of the splenic artery segmentation. *Ver Col Bras Cir* 35(5): 311-314, 2008.
- AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; MCMAHON-PRATT, D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2003,71:401-410.
- ALANEN, A.; PIRA, U.; LASSILA, O.; ROTH, J.; FRANKLIN, R.M. Mott cells are plasma cells defective in immunoglobulin secretion. *Eur J Immunol.* 1985;15(3):235-42.
- ALENCAR, J.E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Veronezi R. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 8a. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p. 706-717.
- ANOSA, V.O.; IDOWU, A.L. The clinic haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. *J Vet Med.* 1983; 30:600-8.
- BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Immunopathogenesis of visceral leishmaniasis. *GazMéd Bahia* 75(1): 24-34, 2005.
- BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *The Vet J* 175: 14-15, 2008.
- BOHLE, A.; MACKENSEN-HAEN, S.; GISE, H.V. Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution. *Am J Nephrol*, 7: 33-421, 1987.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Epidemiológica em Saúde, Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ed. MS, Brasília, DF, 2006.

BURACCO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, R.; MORELLO, E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. J Small Anim Pract. 1997;38(1):29-30.

CARAVACA, F.; MUNHOZ, A.; PIZARRO, J.L. Acute renal failure in visceral leishmaniasis. Am J Nephrol, 11: 350, 1991.

CARRION, J.; NIETO, A.; IBORRA, S.; INIESTA, V.; SOTO, M.; FOLGUEIRA, C.; ABANADES, D.R.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. Parasite Immunol, 28:173-183, 2006.

COSTA, F.A.L.; GUERRA, J.L.; SILVA, S.M.M.S.; KLEIN, R.P.; MENDONÇA, I.L.; GOTO, H. CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. Braz J Med Biol Res. 2000;(33):1455-8.

COSTA, F. A. L., GOTO, H., SALDANHA, L. C. B., SILVA, S. M. M. S., SINHORINI, I. L., SILVA T. C., GUERRA, J. L. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis. Vet Pathol 40:677–684, 2003.

COURTENAY, O.; SANTANA, E.W.; JOHNSON, P.J.; VASCONCELOS, I.A.; VASCONCELOS, A.W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. Trans R Soc. Trop. Med. Hyg.; 1996, 90(5): 498-502.

DOMINGUES, J.A.; TOLEDO, M.T. & MORAES, S.G. Maternal and fetal liver histomorphological analysis of malnourished pregnant rats submitted to exposure to ethanol. Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba 11(3):9-17, 2009.

DUARTE, M.I.; CORBETT, C.E. Leishmaniose visceral. In: Brasileiro G, Filho. Bogliolo Patologia. 5a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1994. p. 1150-60.

DUARTE, M. I. S.; SILVA, M. R. R.; GOTO, H.; NICODEMO, E. L.; AMATO NETO, V. Interstitial nephritis in human kala-azar. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.77, p.531-537, 1983.

ECHEVERRIA P.; DRAN G.; PEREDE G.; RICO A. I.; REQUENA J. M.; ALONSO C.; GUAMERA E.; ANGEL S. O. Analysis of the adjuvant effect of recombinant *Leishmania infantum* Hsp83 protein as a tool for vaccination. Immunol Lett 2001, 76: 107-110.

EL HAG, I.A.; HASHIM, F.A.; EL TOUM, A.; HOMEIDA, M.; EL KALIFA, M. & EL HASSAN, A.M. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kalaazar). J Clin Pathol 47:547-551, 1994.

ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Trends Parasitol., v.20, n.11, p.524-30, 2004.

ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; KAYE. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. Immunol Today., v.21, n.2, p.73-8, 2000.

FERRER, L.M. Leishmaniasis. In: Kirk RW, Bonagura JD. Kirk's Current Veterinary Therapy XI. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p. 266-270.

FISA, R.; RIERA, C.; GÁLLEGO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow. *Veterinary Parasitology*, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA) (2000). Guia de vigilância epidemiológica. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0517A.htm>>, acessado em 2 de janeiro de 2008.

GALVÃO-CASTRO, B. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 56(1): 58-66, 1984.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, C.G.; BLANCO, A.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol* 18:539-546, 1996.

GENARO, O. Leishmania Visceral Americana. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. *Parasitologia Humana*. 10a. Ed. Sao Paulo: Atheneu; 2003. p. 37-53.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte. 1993. 202f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1993.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol*.135(2):100-7, 2006.

GIUNCHETTI R.C., MAYRINK W., CARNEIRO C.M., CORRÊA-OLIVEIRA R., MARTINS-FILHO O.A., MARQUES M.J., TAFURI W.L. & REIS A.B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 84:269-277, 2007.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L. & REIS, A.B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121:23-33, 2008.

GOMES, A.H.S.; FERREIRA, I.M.R.; LIMA, M.L.S.R.; CUNHA, E.A.; GARCIA, A.S.; ARAÚJO, M.F.L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 144: 234-241, 2007.

GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Vet J* 175: 45-52, 2008.

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M. R.; LIMA, M. L. S. R.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F. L.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 144, n. 3-4, p. 234-241, 2007.

GOPEGUI, R.R.; PENIALBA, B.; ESPADA, Y. Hematological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet Rec.* 2004; 155:23-4.

GORCZYASKI, R.M. Nature of resistance to leishmaniasis in experimental rodents. *Dev Comp Immunol.* 1982, 6 (2): 199.

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

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*, 14:229-243, 2001.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet*, v.354, p.1191, 1999.

HIMMELRICH, H.; LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; BIEDERMANN, T.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOCKSLEY, R.M. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J Immunol* 164:4819–4825, 2000.

HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 1995, 89(Suppl1):55-73.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 2007,357:1018-1027.

HOTEZ, P.J. Nuclear weapons and neglected diseases: the “ten-thousand-to-one gap”. *PLoS Negl Trop Dis* 2010, 4:680.

IKEDA, F.A.; FEITOSA, M.M. Métodos de diagnósticos da Leishmaniose Visceral Canina. *Clínica Veterinária*, Ano XII, n.71, p.34-42, 2007.

IKEDA-GARCIA, F.A.; CIARLINI, P.C.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; BOMFIM, S.R.; PERRI, S.H.V. Hematological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2008; 45:68-74.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*, v. 113, n. 2, p.99-113, 2003.

JANNINI, D.S.; OLIVEIRA, I.R.S.; WIDMAN, A.; IANHEZ, L.A. & CERRI, G.G. Morphological and hemodynamic features of the spleen in normal subjects: A Doppler ultrasound study. *RadiolBras* 36(4): 213-218, 2003.

KAYE, P.M.; GORAK, P.; MURPHY, M.; ROSS, S. Strategies for immune intervention in visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 89:75–81, 1995.

KRAAL, G. (1992). Cells in the marginal zone of the spleen. *IntRevCitol* 132:31-74.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAW, K.; BRUNT, E.M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ClinLiverDis*14:591-604, 2010.

LEHMANN, J.; ENSSLE, K.H.; LEHMANN, I.; EMMENDORFER, A.; LOHMANN-MATTHES, M.L. The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. *J Interferon Cytokine Res* 20:63–77, 2000.

LEPAY, D.A.; NATHAN, C.F.; STEINMAN, R.M.; MURRAY H.W.; COHN, Z.A. Murine Kupffer cells. Mononuclear phagocytes deficient in the generation of reactive oxygen intermediates. *J Exp Med*. 1985, 161 (5): 1079-96.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*213: 377-387, 2008.

LIMA, W.G.; OLIVEIRA, P.S.; CALIARI, M.V.; GONÇALVES, R.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007 May 15; 117(1-2): 129-36.

LIPOLDOVA, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews. Genetics*, London, v. 7, n. 4, p. 294-305, Apr. 2006.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clinical Immunology*, v.114, n.3, p. 256-265, 2005.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Ciênc.*, Rio de Janeiro, v.75, n.4, p.469-486, dez 2003.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R. D.; CRINGOLI, G. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.

MELBY, P.C.; OGDEN, G.B.; FLORES, H.A.; ZHAO, W.; GELDMACHER, C.; BIEDIGER, N.M.; AHUJA, S.K.; URANGA, J.; MELENDEZ, M. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun.* 2000; 68:5595–5602.

MELBY, P.C.; TABARES, A.; RESTREPO, B.I.; CARDONA, A.E.; MCGUFF, H.S.; TEALE, J.M. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol* 2001,99:17-25.

MELO, F.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.; ANDRADE, M.; MICHALICK, M.; RASO, P.; TAFURI, W. & TAFURI, W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Am J Trop. Med. Hyg.*, 79(2):198–204, 2008.

MICHALICK, M.S.M. O Gênero *Leishmania*. In: Neves DP, Melo AL, Linard PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 11º ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p.41-46.

MILES, A.S.; CONRAD, S.M.; ALVES, R.G.; JERONIMO, S.M.B.; MOSSER, D.M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med.* 2005, 201(5): 747-54.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005, 366:1561-1577.

MURRAY, H.W.; SPITALNY, G.L.; NATHAN, C.F. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol.* 1985, 134 (3): 1619-22.

MURRAY, H.W.; STERN, J.J.; WELTE, K.; RUBIN, B.Y.; CARRIERO, S.M.; NATHAN, C.F. (1987) Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin-2 and interferon-gamma, tissue immunoreaction, and response to treatment with interleukin-2 and interferon-gamma. *J Immunol* 138:2290–2297.

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

MYLONAKIS, M.E.; PAPAIOANNOU, N.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.I. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol.* 2005;34(3):243-7.

NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, p. 1666–1669 Vol. 40, n.5, 2002.

NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J.A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. *Vet Res.*, v.242, n.1, p.39, 2011.

NUNES, C. M.; DIAS, A. K. K.; GOTTARDI, F. P.; PAULA, H. B.; AZEVEDO, M.A. A.; LIMA, V. M. F.; GARCIA, J. F. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007.

OLIVEIRA, G.G.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993, 88 (2): 243-8.

OLSEN, T.S.; WASSEF, N.F.; OLSEN, H.S.; HANSEN, H.E. Ultrastructure of the kidney in acute interstitial nephritis. *Utrastruct Pathology*, 10: 1-16, 1986.

PACIELLO, O.; WOJCIK, S.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; TRAPANI, F.; IOVANE, V.; POLITANO, L.; PAPPARELLA, S. Syrian hamster infected with *Leishmania infantum*: a new experimental model for inflammatory myopathies. *Muscle Nerve*, 41:355-361, 2010.

PEREIRA, F.A.L. Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício 43-82 Brasileiro Filho G., Bogliolo, *Patologia Geral*. 7ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

PEREIRA, S.A.L.; CORRÊA, B.S.; MINICUCCI, G.P.; LOPES, G.M.A.; CASTRO, E.C.C.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A. Weight of the spleen in chronic chagasic patients. *RevSoc. Bras. Med. Trop* 32(2): 167-170, 1999.

PIMENTA, P. F. P.; DE FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular - A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. 12: 1-45, 2012.

RAVINDRAN, R.; BHOWMICK, S.; DAS A.; ALI, N. Comparison of BCG, MPL and cationic liposome adjuvant systems in leishmanial antigen vaccine formulations against murine visceral leishmaniasis. *BMC Microbiol* 2010,10:181.

REQUENA, J.M.; SOTO, M.; DORIA, M.D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the gold in hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 2000, 76:269-281.

RODRIGUEZ, E. H. G.; BRITO, M. E. F.; MENDONÇA, M. G.; WERKHAUSER, R.P.; COUTINHO, E. M.; SOUZA, W. V.; ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. C. Evaluation of PCR for diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on Leishman's bodies. *British Medical Journal*, v.2, p.1261-1401, 1903.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L.A.R.; OLIVEIRA, G.G.S.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C. & DOS-SANTOS, W.L.C. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol* 30: 515–524, 2008.

SANTOS, W.L.C.; BADAROL, J.D.R.; DE-FREITAS, L.A.R. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* (92):89-94, 2004.

SVS. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (LV). Brasília: Ministério da Saúde; 2003.

SILVA, M. V. Leishmanioses. *Rev. Fac. Ciênc. Méd, Sorocaba*, v.5, n.2, p. 13-17, 2003.

PEREIRA, B.A.; ALVES, C.R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol.* 2008, 158 (4): 239-55.

SOLANO-GALLEGO L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL P.; FONDEVILA, P.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A., et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol.* 2004;(130):7-12.

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

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology.* Feb-Mar; 85(2): 138-47, 2007.

TAFURI, W. L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, J.A. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*, v.38, p.81-89, 1996.

TRONCARELLI, M.Z.; MACHADO, J.G.; CAMARGO, L.B.; HOFFMANN, J.L.; CAMOSSI, L.; GRECA, H.; FACCIOLI, P.Y.; LANGONI, H. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e de tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. *Vet Zootec* 15: 39-46, 2008.

WESTERMANN, J.; PABST, R. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *J Molecular Medicine* 70(7): 539-544, 1992.

WILSON, M.E.; SANDOR, M.; BLUM, A.M.; YOUNG, B.M.; METWALI, A.; ELLIOTT, D.; LYNCH, R.G.; WEINSTOCK, J.V. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue specific replication of *Leishmania chagasi*. *J Immunol.* 1996, 156 (6): 2231–9.

WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.B.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis* 38: 147–160, 2005.

XAVIER, S.C.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, L.W. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58(6): 994-1000, 2006.

YAMAGUCHI, R.A.; FRENCH, T.W.; SIMPSON, C.F.; HARVEY, J.W. *Leishmania donovani* in the synovial fluid of a dog with visceral leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1983; 19:723-6.

ZANIN, F.H.; COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; MARQUES-DA-SILVA, E.A.; COSTA, M.M.S.; REZENDE, S.A.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes and Infection*, 9:1070–1077, 2007.