



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



NARJARA ALCÂNTARA SACRAMENTO

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DO FÍGADO DE
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* E
TRATADOS COM A VACINA TERAPÊUTICA LBMPL.**

Ouro Preto – MG

Dezembro de 2019

NARJARA ALCÂNTARA SACRAMENTO

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DO FÍGADO DE
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum* E
TRATADOS COM A VACINA TERAPÊUTICA LBMPL.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt

Co-orientadora: Dr^a Jamille M. de Oliveira Cardoso

Ouro Preto – MG

Dezembro de 2019



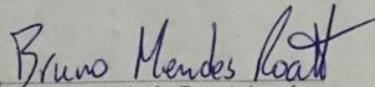
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

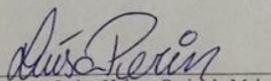
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

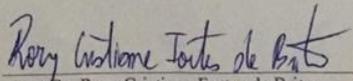
Escola de Farmácia



ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 469ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 06 dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove, sexta-feira, realizou-se, a partir das 10 horas e 10 minutos, no laboratório de farmacologia da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Narjara Alcântara Sacramento**, matrícula **12.1.2249**, intitulada **“Avaliação histopatológica e parasitológica do fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e tratados com a vacina terapêutica LBMPL”**. A banca examinadora foi constituída pela Dra. Luisa Helena Perin de Melo, pela Dr. Rory Cristiane Fortes de Brito e pelo orientador Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt. De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua aprovação, com a NOTA 8,0. Comunicou-se ao candidato que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada e após a leitura pública seguirá assinada pelos membros da banca examinadora e pela presidente do colegiado. Ouro Preto, 06 de dezembro de 2019.


Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt /orientador


Dra. Luisa Helena Perin de Melo


Dr. Rory Cristiane Fortes de Brito

Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus e ao universo que me guiaram até a conclusão dessa etapa.

Aos meus pais, Ana Maria e Josué pelo amor incondicional, apoio e por serem exemplos de vida.

Aos meus amigos de Lafaiete que mesmo distantes se fizeram presentes, ao longo desses anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bruno Roatt pela oportunidade, ensinamentos, confiança e apoio.

A minha co-orientadora, Dr^a. Jamille Mirelle De Oliveira Cardoso pela dedicação, disposição, carinho e por todos os ensinamentos.

Aos professores da graduação pelo aprendizado diário.

Aos amigos e colegas da Escola de Farmácia.

Aos cães que contribuíram com está pesquisa

A todos que de alguma maneira me ajudaram a chegar até aqui, minha eterna gratidão.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é um zoonosea altamente prevalente no Brasil e em algumas regiões do mundo. No entanto, o tratamento quimioterápico de cães doentes não leva à cura parasitológica, ficando evidente a necessidade de estudos que busquem melhoria das práticas para tratamento da LVC. Assim, estudos recentes avaliaram uma vacina terapêutica, composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante monofosforil lipídeo A, denominada vacina LBMPL, em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Tal imunoterapia demonstrou resultados animadores no âmbito hemato-bioquímico, imunológico, clínico e parasitológico (medula óssea, pele e baço). No entanto, as possíveis alterações histopatológicas e parasitológicas no compartimento hepático, importante sítio do parasito não foi avaliado. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil histopatológico e parasitológico do fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e sintomáticos submetidos ao tratamento com a vacina terapêutica LBMPL. Para tal, foram utilizados quatro grupos de cães: grupo CN (não infectados e não tratados, n=5), grupo INT (infectados e não tratados, n=7), grupo MPL (infectados e tratados com o adjuvante MPL, n=6) e grupo LBMPL (infectados e tratados com a vacina LBMPL, n=10). Após eutanásia, amostras de fígado foram coletadas para avaliação histopatológica semi quantitativa (degeneração hidrópica e inflamação portal) e quantitativa (inflamação) e avaliação parasitológica por imunohistoquímica e PCR em tempo real (qPCR). Nossos resultados demonstraram que os animais do grupo LBMPL apresentaram redução da frequência de alterações histopatológicas como degeneração hidrópica e inflamação portal. Além disso, foi observado um menor número de células inflamatórias presentes no parênquima hepático nesse grupo. Em relação à carga parasitária por imunohistoquímica, apesar da redução no grupo LBMPL, esta não foi significativa. Por outro lado, foi observada uma redução desse parâmetro no grupo LBMPL quando utilizado a qPCR. Assim, demonstramos uma melhora histopatológica e parasitológica no fígado dos cães tratados com a vacina LBMPL. Dessa forma, evidenciamos em nosso trabalho a importância dessa imunoterapia em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, uma vez que a mesma se mostra efetiva diante dos parâmetros e técnicas analisadas, despontando assim como uma potencial estratégia terapêutica a ser aplicada como proposta de tratamento na LVC.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, Leishmaniose visceral canina, vacina LBMPL

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a highly prevalent zoonosis in Brazil and in some regions of the world. However, chemotherapeutic treatment of dogs doesn't cause parasitological cure, and the need for studies that improve treatment practices for CVL is evident. Thus, recent studies have evaluated a therapeutic vaccine composed of *L. brasiliensis* antigens associated with the adjuvant monophosphoryl lipid A, called LBMPL, in vaccines naturally infected with *L. infantum*. This immunotherapy showed encouraging results in the blood-biochemical, immunological, clinical and parasitological field (bone marrow, skin and spleen). However, possible histopathological and parasitological changes in the hepatic compartment, an important site of the parasite, have not been evaluated. The objective of this study was to evaluate the histopathological and parasitological profile of the liver of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and symptomatic dogs treated with the therapeutic LBMPL vaccine. Four groups of dogs were used: CN group (uninfected and untreated, n = 5), INT group (infected and untreated, n = 7), MPL group (infected and treated with MPL adjuvant, n = 6) and LBMPL group (infected and treated with LBMPL vaccine, n = 10). After euthanasia, liver samples were collected for semi quantitative histopathological (hydropic degeneration and portal inflammation), quantitative (inflammation) and parasitological evaluation by immunohistochemistry and real-time PCR (qPCR). Our results showed that the animals of the LBMPL group presented a reduction in the frequency of histopathological alterations such as hydropic degeneration and portal inflammation. In addition, a lower number of inflammatory cells present in the liver parenchyma was observed in this group. Regarding the parasite load by immunohistochemistry, despite the reduction in the LBMPL group, this was not significant. In nother way, a reduction of this parameter was observed in the LBMPL group when qPCR was used. We demonstrated a histopathological and parasitological improvement in the liver of dogs treated with the LBMPL vaccine. Thus, in our work we highlight the importance of this immunotherapy in dogs naturally infected by *L. infantum*, since it is effective in view of the parameters and techniques analyzed, thus emerging as a potential therapeutic strategy to be applied as a treatment proposal in LVC.

Keywords: *Leishmania infantum*, Canine visceral leishmaniasis, LBMPL vaccine

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA- Albumina de soro bovino

CCA- Centro de Ciência Animal

CD4⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares

CD8⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos

CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CMSP - Células mononucleares do sangue periférico

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CO₂ - Dióxido de carbono

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

CETDVL - Canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPP® - *Dual Path Platform*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPI - Equipamento de proteção individual

IL-4 - Interleucina 4

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

KCl – cloreto de sódio

LBMPL- Vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante monofosforil lipídeo A

LIT – Infusão de triptose hepática

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

LVH - Leishmaniose visceral humana

MPL - Monofosforil lipídeo A

MS - Ministério da Saúde

NNN/LIT - *Novy-MacNeal-Nicolle*- Infusão de triptose hepática

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato salina

RPMI - *Roswell Park Memory Institute* (Meio de cultivo celular)

SFB - Soro fetal bovino

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. Leishmaniose visceral.....	13
2.2. Aspectos clínicos e imunológicos da LVC.....	14
2.3. O fígado na leishmaniose visceral canina.....	15
2.4. Tratamento da leishmaniose visceral canina.....	16
3. JUSTIFICATIVA.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo Geral	19
4.2. Objetivo específico.....	19
5. METODOLOGIA.....	20
5.1. Manejo dos animais.....	20
5.2. Grupos Experimentais.....	21
5.3. Eutanásia e coleta de amostras de fígado	23
5.4. Avaliação histopatológica do fígado	23
5.5. Avaliação semiquantitativa do fígado	24
5.6. Avaliação morfométrica do fígado.....	24
5.7. Análise imunohistoquímica para avaliação da carga parasitária no fígado	24
5.8. Análise molecular para avaliação da carga parasitária no fígado	25
5.8.1. Extração de DNA das amostras de fígado	25
5.8.2. Extração de DNA da massa de promastigotas de <i>L. infantum</i> e construção da curva padrão.....	26
5.8.3. Quantificação de carga parasitária e análise do gene constitutivo	27
5.9. Análise estatística	29
6.RESULTADOS.....	30
6.1. Avaliação histopatológica qualitativas: degeneração hidrópica e inflamação portal	30
6.2. Avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório hepático.....	33
6.3. Avaliação da carga parasitária por imunohistoquímica.....	34
6.4. Avaliação da carga parasitária por PCR em tempo real	35
7. DISCUSSÃO.....	37

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 42

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é um grave problema de saúde pública que se encontra em franca expansão em todo o mundo. O número crescente de casos em território brasileiro tem sido um desafio para o Ministério da Saúde, principalmente devido a expansão da doença para os grandes centros urbanos (Brasil, 2017; WHO, 2017). Este fato está muitas vezes associado a ineficiência das medidas de controle da doença e a ausência de ferramentas profiláticas disponibilizadas pelas agências de controle no país.

Dentro do ciclo zoonótico da LV, destaca-se o cão, uma vez que ele é considerado o principal reservatório doméstico do parasito e atrativa fonte alimentar para a fêmea do inseto vetor, tornado a leishmaniose visceral canina (LVC) mais importante do ponto de vista epidemiológico do que a LV humana (Molina et al. 1994; Reis et al. 2006, Coura-Vital et al. 2011). Devido a esse fato, a eliminação de cães soropositivos é uma das principais medidas de controle da LV no Brasil (MS, 2006). No entanto, perante principalmente o vínculo afetivo entre cães e seus donos, é cada vez mais comum o tratamento de cães com LV com os mesmos fármacos utilizados para o tratamento da leishmaniose visceral humana (LVH) nas diferentes áreas endêmicas de todo o mundo. Todavia, essa medida é proibida no Brasil (Portaria Interministerial - Ministérios da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Nº 1.426, de 11 de julho de 2008) uma vez que a questão envolvendo o tratamento canino ainda é bastante controversa. Diversos são os riscos associados ao tratamento de cães com LV, pois mesmo tratados esses animais continuam a ser fonte de infecção para o vetor (Baneth e Shaw, 2002; Noli & Auxilia, 2005; Solano Gallego et al. 2011), além da possibilidade de seleção de cepas resistentes do parasito frente às drogas convencionais (Dantas Torres & Brandão Filho, 2006). Apesar de suas muitas desvantagens, Miró e colaboradores (2011) acreditam que atualmente a quimioterapia deve ser aplicada em cães doentes, pois tem benefícios em termos de redução da prevalência e incidência da doença, bem como no controle do ciclo biológico do parasito.

Nos últimos anos, pesquisadores de todo mundo, tem direcionado seus esforços a fim de desenvolver novas estratégias de tratamento, menos tóxicas e que não só proporcionem uma melhora clínica, mas também reduzam drasticamente a carga parasitária em cães com LV. Nesse sentido, a imunoterapia tem ganhado grande atenção na busca por estratégias terapêuticas mais efetivas, menos tóxicas e mais acessíveis para o tratamento da doença. Dessa

forma, nosso grupo de pesquisas avaliou recentemente a ação terapêutica de uma vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associados ao adjuvante Monofosforil lipideo A (MPL) no tratamento da LVC em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e sintomáticos, denominada vacina LBMPL (Roatt, et al. 2017). Tal imunoterapia demonstrou resultados bastante promissores em relação à normalização dos parâmetros hemato-bioquímicos, reativação da resposta imunológica, controle do parasitismo tecidual e cura clínica na maioria dos animais submetidos ao tratamento. Diante destes resultados promissores, nosso grupo de pesquisas decidiu avaliar como os compartimentos viscerais e dentre este o fígado reagiu após a imunoterapia com a vacina LBMPL. Neste sentido, é importante avaliar os aspectos histopatológicos do fígado desses animais, uma vez que este órgão é um dos principais acometidos pelo parasito.

Para se entender o benefício da terapêutica na doença, é importante compreender as alterações observadas durante o curso clínico da LVC sintomática. Em se tratando das alterações hepáticas decorrentes da LV em cães infectados por *L. infantum*, é possível observar semelhanças em relação ao fígado de indivíduos infectados por este mesmo parasito onde estes apresentam alterações como hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer com parasitismo variável nessas células, bem como nos macrófagos nos tratos portais. Além disso, infiltrado inflamatório no espaço porta e no parênquima, degeneração hidrópica de hepatócitos e fibrose pericelular (Giunchetti, et al. 2008; Lima et al. 2019). Em cães sintomáticos, essas alterações são observadas com maior intensidade comparado à cães assintomáticos e oligossintomáticos (Giunchetti et al. 2008). Assim, a avaliação parasitológica e histopatológica do compartimento hepático é extremamente importante para que se entenda como curso natural da LV canina apresentou regressão ou progressão após a intervenção terapêutica utilizando a vacina LBMPL como estratégia de tratamento para a doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leishmaniose visceral

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos da ordem Kinetoplastida e do gênero *Leishmania*, sendo responsáveis por um amplo espectro de doenças variando de uma forma cutânea pontual até uma forma sistêmica aguda, onde o indivíduo evolui ao óbito rapidamente quando não tratado (Ross, 1903; WHO, 2017). Assim, as leishmanioses são consideradas um grave problema de saúde pública em vários países, dentre os quais se destacam países da África, Europa, Ásia e Américas. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que essa doença está em franca expansão ao redor do mundo, se enquadrando entre as nove doenças tropicais mais negligenciadas da atualidade. Globalmente são registrados mais de 500 mil casos por ano. Nos últimos anos, 90% dos novos casos relatados a OMS são oriundos de seis países (Bangladesh, Índia, Nepal, Etiópia, Sudão e Brasil), sendo o Brasil, o de maior incidência nas Américas (WHO, 2017).

No contexto epidemiológico da LV zoonótica vale ressaltar a presença do cão, que possui grande importância no ciclo evolutivo da doença no ambiente doméstico (Deane, et al. 1956; Alvar, et al. 2004). Esses animais atuam como reservatórios primários do parasito, apresentando uma alta carga parasitária cutânea e servindo como atrativa fonte alimentar para o inseto vetor (Borges, et al. 2009). Devido a essa importância, no Brasil, o manual de vigilância e controle da LV é fundamentado em uma tríade de profilaxias alicerçada no combate ao inseto vetor, tratamento dos casos humanos e eliminação de cães soropositivos (MS, 2014). Neste contexto, a LVC é um grande problema de saúde pública e medicina veterinária (Silva, et al. 2017). Dados sobre a LVC indicam que esta doença é endêmica em mais de 70 países, sendo estimado que pelo menos 2,5 milhões de cães estejam infectados atualmente por *L. infantum* somente no Sudoeste da Europa (Solano-Gallego, et al., 2011). Da mesma forma, o número de cães infectados nas Américas é estimado em milhões e a maior prevalência entre os treze países onde a doença é notificada no Novo Mundo ocorre na Venezuela e no Brasil (Baneth, et al. 2008; Solano-Gallego, et al. 2011; Gradoni, et al. 2015).

2.2 Aspectos clínicos e imunológicos da leishmaniose visceral canina

A LVC pode manifestar-se pelo acometimento de vários órgãos, pois trata-se de uma doença sistêmica, com grande potencial patológico. As manifestações clínicas da doença são consequências de inúmeros mecanismos patogênicos relacionados a interação parasito hospedeiro, principalmente em órgãos chave da resposta imunológica como o baço e a medula óssea além de fígado e linfonodos, refletindo um complexo mecanismo de defesa e ataque do hospedeiro e do parasito, respectivamente (Baneth, et al, 2008).

De forma geral, em relação aos aspectos clínicos da LVC, esta parasitose evolui de um estado assintomático, onde não há manifestação de sinais e sintomas clínicos, para oligossintomático, onde há poucos sintomas, podendo posteriormente progredir para um quadro clínico crítico, repleto de sinais e sintomas clínicos. Nos animais sintomáticos, os aspectos clínicos mais observados no tecido cutâneo incluem descamação do epitélio, pequenas úlceras nasais, feridas distribuídas pelo corpo, principalmente localizadas mais na região da cauda, articulações, focinho e orelhas. Observa-se, com grande frequência, onicogribose, alopecia generalizada, paraplesia e uma hipertrofia de fígado e baço. Nos casos mais avançados da doença, inúmeros animais evoluem para o óbito (Manciantti, et al. 1988; Baneth, et al. 2008; Salzo, et. al. 2008; Reis, et. al. 2009).

Diante desse cenário, diversos estudos vêm sendo conduzidos no intuito de entender os mecanismos imunológicos relacionados ao controle do parasitismo e ao estabelecimento de formas clínicas em cães com LV. Cães infectados que apresentam padrão de resistência natural à doença, demonstram uma potente ativação da resposta imune celular marcada por ativação de células T, enquanto animais suscetíveis apresentam uma resposta humoral exagerada e ineficaz (Solano Gallego et al., 2000; Solano Gallego, et al., 2009). Assim, a sintomatologia da LVC está relacionada com a produção de uma resposta imunológica não protetora. Muitos estudos ressaltam a importância das citocinas IL-10 e IL-4 na suscetibilidade à infecção por *L. infantum*, uma vez que essas citocinas atuam imunomodulando negativamente a proliferação de células T e a ativação dos macrófagos (Murray, et al., 2002; Morre, et al., 2001). Já a ausência de sintomas ocorre devido a ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ principalmente pela liberação de citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α que vão ativar a resposta imunológica, combatendo assim a doença (Alvar, et. al. 2004; Baneth, et al. 2008).

2.3 O fígado na leishmaniose visceral canina

Com o objetivo de entender melhor os eventos relacionados a imunopatologia compartimentalizada na LVC, vários grupos de pesquisa vêm realizando uma ampla investigação com enfoque histopatológico em órgãos nos quais o parasito apresenta tropismo como medula óssea, baço, linfonodo e fígado (Reis, et al. 2009).

Em relação ao tecido hepático, é demonstrado que esse órgão desempenha um papel central em cães com LV. Estudos em cães infectados naturalmente por *L infantum* indicam uma relação direta entre a resolução da infecção e a formação e maturação de granulomas, que são agregados concisos de macrófagos parasitados ou não, células epitelioides, plasmócitos e raros neutrófilos, circundado por um halo de linfócitos que se encontram dispersos no parênquima (Giunchetti et al 2008; Melo et al. 2009). Além disso, alterações histopatológicas como inflamação do espaço porta, com característico infiltrado mononuclear, inflamação em diferentes regiões do órgão, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer e degenerações são observadas (Giunchetti, et. al. 2008; Reis, et. al. 2009).

Em se tratando dos perfis de resistência e susceptibilidade e a indução das formas clínicas polares, é observado que cães sintomáticos apresentam uma carga parasitária mais elevada nesse órgão e alterações inflamatórias estruturais mais intensas em comparação com cães assintomáticos, encontrando-se estes fatores intimamente relacionados. Além disso, também é observado que estas alterações histológicas estão associadas a alterações nos parâmetros bioquímicos relacionados com a função hepática, principalmente os níveis séricos de albumina, globulinas e da razão A/G (Giunchetti, et al. 2008; Reis, et al. 2009). Em modelo canino é demonstrado que cães assintomáticos apresentam níveis mais elevados das citocinas TGF- β , TNF- α , IFN- γ e iNOS no fígado, em comparação com cães sintomáticos (Corrêa et al. 2007, Maia & Campino, 2012). Foi observado ainda que cães naturalmente infectados por *L. infantum* e sintomáticos apresentam uma clara incapacidade na expressão de quimiocinas e seus receptores no compartimento hepático, comparativamente aos animais assintomáticos, resultando assim numa deficiente resposta imune contra *Leishmania infantum* (Nascimento et al. 2013).

Ao realizar uma análise histopatológica do fígado de 57 animais com sorologia positiva para LVC, Barros e colaboradores (2011) constataram que 93% dos animais apresentavam algum tipo de infiltrado inflamatório e em 40% deles era observado formas amastigotas do

parasito, além de lesões congestivas e degenerativas hepáticas. Achados como hemorragia, pigmentos de hemossiderina, necrose centrolobular, degeneração glicogênica, cirrose, edema perivascular e acentuada retenção biliar foram menos frequentes (Barros et al, 2011). Dessa forma, é importante a avaliação do compartimento hepático, que é extremamente comprometido durante a doença sintomática, após a utilização de uma terapia que visa a estimulação da resposta imune como forma de combate ao parasito e se esta estratégia promove a regressão das alterações observadas durante a infecção sintomática na LVC.

2.4 Tratamento da leishmaniose visceral canina

Apesar de não aconselhável e perante principalmente ao vínculo afetivo entre cães e seus donos, é cada vez mais comum o tratamento de cães com LV utilizando os mesmos fármacos aplicados para o tratamento da doença humana nas diferentes áreas endêmicas do mundo. Para tal são utilizados os antimoniais pentavalentes e anfotericina B entretanto, esta conduta é ilegal no Brasil e em caso de denúncia, o veterinário tem seu registro cassado (Oliveira et al., 2004). Tais terapias são efetivas até certo ponto, no entanto esses fármacos são extremamente tóxicos e podem causar um comprometimento irreversível de órgãos como fígado, rim e coração levando o animal ao óbito (Oliveira et al., 2004). Além disso, a excreção e eliminação dos fármacos em cães são diferentes do que é observado nos seres humanos o que gera um risco iminente do surgimento de cepas resistentes do parasito nestes casos.

Em 2016, por meio da Nota Técnica Conjunta, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde foi autorizado o registro do fármaco Milteforan[®], de propriedade da empresa Virbac Saúde Animal, indicado para o tratamento da LVC. O licenciamento do medicamento foi emitido respeitando as determinações da Portaria Interministerial n° 1.426 de julho de 2008, que regulamenta o tratamento de cães com LV, proibindo o tratamento com produtos de uso humanos ou não registrados no MAPA. Entretanto, já há dados na literatura que indicam que o tratamento com miltefosina leva a uma melhora clínica transitória e entre 3-6 meses após o tratamento os animais voltam a manifestar sinais e sintomas clínicos da doença.

Tendo em vista todo caminho já percorrido pela ciência, bem como seus percalços, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento como o reposicionamento de farmacológico, novas formulações de fármacos antigos, a imunoterapia utilizando vacinais e imunomoduladores, se fazem necessárias e urgentes uma vez que, para o tratamento das

leishmanioses temos um pequeno arsenal terapêutico que apresenta diversos efeitos colaterais, bem com a já relatada co-infecção HIV/*L. infantum* e o surgimento de cepas resistentes do parasito. Nesse sentido, Roatt e colaboradores (2017) avaliaram a eficácia terapêutica da vacina LBMPL, formulada a base de antígenos de *Leishmania braziliensis* associada ao adjuvante MPL denominada vacina LBMPL. Nesse estudo foi realizado um ensaio pré-clínico em cães sintomáticos, naturalmente infectados por *L. infantum*. Os animais imunotratados com a vacina LBMPL apresentaram uma melhora significativa dos sinais e sintomas clínicos com redução intensa dos sinais clínicos e redução no *score* clínico de 75%, aumento de peso corporal e redução da esplenomegalia. Além disso, foi observado normalização dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ circulantes, aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ bem como redução na produção de IL-4 por esses linfócitos e aumento dos níveis de TNF- α com diminuição acentuada na produção de IL-10. De forma importante, foi observado ainda diminuição drástica da carga parasitária na medula óssea, pele e baço, além de redução da infectividade de fêmeas de flebotomíneos alimentadas após o tratamento, demonstrando o potencial uso dessa vacina como estratégia de tratamento para a LV (Roatt et al. 2017).

Levando em consideração os resultados promissores obtidos e da importância do fígado como local de permanência do parasito e na geração de resposta imune, uma análise histopatológica bem como uma análise parasitológica detalhada do fígado dos animais imunotratados com a vacina terapêutica LBMPL, é fundamental para avaliar o potencial de contribuição desse tratamento em cães com LV.

3. JUSTIFICATIVA

A LV é uma das doenças mais negligenciadas no mundo, que afeta principalmente os países mais pobres e encontra-se em franca expansão em várias regiões rurais, periurbanas e urbanas do Brasil. O cão é o principal reservatório doméstico do parasito no ciclo zoonótico, ocupando posição de destaque na cadeia epidemiológica de transmissão do parasito, tornando a LVC uma zoonose altamente prevalente. No entanto, o uso indiscriminado da quimioterapia pra LV humana aplicada ao tratamento da LVC tem dificultado o controle dessa doença, já que os fármacos atuais não levam à cura parasitológica na LVC. Dessa maneira, relatos de cepas resistentes do parasito têm sido descritos e a busca por novos fármacos e/ou novas estratégias de tratamento é fundamental e urgente. Além disso, até o momento não existem vacinas comprovadamente eficazes que possam ser empregadas na profilaxia da doença humana e canina. Dessa forma, a avaliação de novas estratégias terapêuticas como a utilização de uma vacina terapêutica (LBMPL) é de extrema importância, principalmente em casos mais graves de LV. Tendo em vista que o fígado é um dos órgãos mais acometidos pelo parasito e buscando avaliar a possível toxicidade relacionada ao tratamento, torna-se fundamental avaliar o quadro histopatológico e parasitológico hepático de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, submetidos à imunoterapia com vacina LBM

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil histopatológico e parasitológico do fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e sintomáticos submetidos ao tratamento com a vacina terapêutica LBMPL.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar, de forma qualitativa, as principais alterações histopatológicas hepáticas; como degeneração hidrópica e inflamação portal;
- Quantificar o processo inflamatório no fígado;
- Quantificar por imunohistoquímica a carga parasitária no fígado;
- Quantificar por qPCR a carga parasitária no fígado.

5. METODOLOGIA

5.1 Manejo dos animais

Foram utilizados nesse estudo 28 cães naturalmente infectados por *L. infantum* provenientes de Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil), área endêmica para a LV no estado. Como critério de inclusão, esses animais deveriam apresentar um ou mais sinais clínicos sugestivos de LVC ao exame físico (sintomáticos) e resultados sorológicos positivos no teste rápido (DPP®) e imunoenzimático (ELISA). Todos os procedimentos de manipulação dos animais estão em acordo com os princípios éticos da experimentação animal, aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFOP (CEUA-UFOP), conforme o protocolo nº 2010/57. É importante ressaltar que esses animais fizeram parte do doutorado do professor Dr. Bruno Mendes Roatt. Assim sendo, todos os procedimentos de manejo dos animais, tratamentos terapêuticos e a coleta de amostras biológicas, foram conduzidos pelo mesmo.

Este trabalho foi realizado mediante um convênio de cooperação técnico científica com a Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Governador Valadares - MG representada pelo Centro de Controle de Zoonoses do município (CCZ/GV). Os animais foram doados pelos seus donos após esclarecimentos de todas as dúvidas referentes a esse processo e posterior assinatura do termo de consentimento livre esclarecido. Após recolhimento dos animais, esses foram trazidos e alocados no Canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CETDVL/CCA/UFOP), que possui baias coletivas, com área coberta e aberta (solário), o que favorece a incidência de luz solar e ventilação adequada. Todo o canil, incluindo as áreas de solário, é recoberto por telas de aço inox AISI 304 fios 34, para impedir o possível contato entre animais infectados por *L. infantum* e seu hospedeiro invertebrado natural.

Os animais foram distribuídos respeitando a lotação máxima de cinco cães por baia para atender as necessidades fisiológicas e comportamentais (micção e defecação, manutenção da temperatura corporal, movimentação e ajustes de postura), gênero, além da interação social coespecífica e desenvolvimento de hierarquias entre eles. A dieta durante todo o período experimental foi baseada em ração comercial balanceada do tipo Premium (Nero

Refeição®, Total Alimentos, Brasil), e água potável. A limpeza das baias, além da alimentação dos animais, foi realizada diariamente por técnico paramentado com equipamentos de proteção individual (EPI) e devidamente treinado para tais tarefas.

Antes da alocação dos cães aos grupos foi realizado um procedimento conhecido por "vazio sanitário", que consisti na restrição à presença de qualquer animal nas baias por período mínimo de 30 dias, mais o tempo necessário para a realização dos procedimentos de desinfecção das instalações, totalizando 35-40 dias. A desinfecção química é realizada com solução de hipoclorito de sódio a 1% (Hipoclorito de Sódio 10%, Sulfal Química Ltda, Brasil). Vinte e quatro horas antes da entrada dos animais no recinto as paredes internas e externas do canil e das baias, incluindo as telas protetoras, foram borrifadas com inseticida de poder residual a base de deltametrina, na dose de 25 mg/m² (K-Otrine CE25®, Bayer CropscienceLtda, Brasil).

5.2 Grupos experimentais

Após a distribuição aleatória dos cães nos quatro grupos experimentais, por meio de sorteio, os animais foram submetidos aos protocolos de imunoterapia descritos a seguir:

Grupo Controle MPL (MPL): este grupo foi composto por seis cães (dois machos e quatro fêmeas) que receberam, três séries apenas do adjuvante MPL em água de injeção, pela via subcutânea na região dorsal (cada série composta por 10 doses - 1 dose/dia), com intervalo de descanso de 10 dias entre cada série, distribuídas da seguinte forma:

1ª Série: foram administradas 10 doses do adjuvante MPL sendo 1 dose/diária em ordem crescente de concentração do adjuvante monofosforil lipídeo A (MPL) (Sigma Co., E.U.A) idêntica a concentração administrada no grupo LBMPL. No primeiro dia foi administrada uma dose contendo 5µg de MPL em 100µL de água de injeção; segundo dia 10µg de MPL em 200µL de água de injeção; terceiro dia 15µg de MPL em 300µL de água de injeção; quarto dia 20µg de MPL em 400µL de água de injeção; quinto dia 25µg de MPL em 500µL de água de injeção; do sexto ao décimo dia desta série foram administrados diariamente uma dose contendo 25µg de MPL em 500µL de água de injeção. Após a conclusão da primeira série os animais foram submetidos a um descanso (intervalo) de 10 dias.

2ª Série: foi iniciada 10 dias após a 1ª série sendo os animais submetidos a administração de 10 doses (1 dose/diária), do primeiro ao décimo dia, contendo 25µg de MPL em 500µL de água de injeção diariamente. Após a conclusão da segunda série os animais foram submetidos a um descanso (intervalo) de 10 dias.

3ª Série: foi iniciada 10 dias após a 2ª série sendo os animais submetidos a administração de 10 doses, do primeiro ao décimo dia, contendo 25µg de MPL em 500µL de água de injeção diariamente.

Grupo Vacina LBMPL (LBMPL): este grupo foi composto por dez cães (cinco machos e cinco fêmeas) que receberam três séries de imunoterapia pela via subcutânea na região dorsal (cada série composta por 10 doses - 1 dose/dia), com intervalo de descanso de 10 dias entre cada série, distribuídas da seguinte forma:

1ª Série: foram administradas 10 doses vacinais sendo 1 dose/diária em ordem crescente de concentração de antígeno de *L. braziliensis* e adjuvante monofosforil lipídeo A (MPL) (Sigma Co., EUA). No primeiro dia foi administrada uma dose vacinal contendo 60µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 5µg de MPL em 100µL de água de injeção; segundo dia 120µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 10µg de MPL em 200µL de água de injeção; terceiro dia 180µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 15µg de MPL em 300µL de água de injeção; quarto dia 240µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 20µg de MPL em 400µL de água de injeção; quinto dia 300µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 25µg de MPL em 500µL de água de injeção; do sexto ao décimo dia desta série foram administrados diariamente uma dose contendo 300µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 25µg de MPL em 500µL de água de injeção. Após a conclusão da primeira série os animais foram submetidos a um descanso (intervalo) de 10 dias.

2ª Série: foi iniciada 10 dias após a 1ª série sendo os animais submetidos a administração de 10 doses vacinais (1 dose/diária), do primeiro ao décimo dia, contendo 300µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 25µg de MPL em 500µL de água de injeção diariamente. Após a conclusão da segunda série os animais foram submetidos a um descanso (intervalo) de 10 dias.

3ª Série: foi iniciada 10 dias após a 2ª série sendo os animais submetidos a administração de 10 doses vacinais, do primeiro ao décimo dia, contendo 300µg de antígeno total de *L. braziliensis* + 25µg de MPL em 500µL de água de injeção diariamente.

Os animais de ambos os grupos foram acompanhados por 90 dias após os distintos tratamentos, sendo então realizada a eutanásia e necropsia dos mesmos.

Foi utilizado nesse estudo mais dois grupos controles, provenientes de material já coletado e arquivado em nosso laboratório, descritos a seguir:

Grupo Controle não infectado – controle negativo (CN): este grupo foi composto por cinco cães (2 machos e 3 fêmeas), provenientes do Canil de experimentação do Centro de Ciência Animal (CCA/UFOP). Tais animais eram negativos para LV, confirmado por testes sorológicos.

Grupo Controle Infectado e não tratados (INT): este grupo foi composto por sete animais (3 machos e 4 fêmeas), provenientes da região endêmica de Governador Valadares (Minas Gerais). Tais animais eram positivos para LV, confirmado por testes sorológicos.

5.3 Eutanásia e coleta de amostras de fígado

Após o período de experimentação, os animais foram submetidos ao processo de eutanásia, utilizando associação de 22 mg/kg de Cloridrato de Quetamina (Ketamina Agener®, Agener União, Brasil) e 2,0 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Calmium®, Agener União, Brasil) por via intramuscular, como protocolo de anestésico e aplicação, por via endovenosa lenta, de 20mg/kg de tiopental sódico (Thiopentax 1g, Cristália, Brasil) até obtenção do estado de anestesia geral. Imediatamente foi aplicado, por via endovenosa, uma dose letal de solução de cloreto de potássio saturada (KCl), para a obtenção de parada cardiorrespiratória. Após a confirmação do óbito, os animais foram submetidos a exame necroscópico, com avaliação macroscópica, seguida de retirada de fragmentos do fígado que foram armazenados em formol tamponado para posterior análises histopatológicas e imuno-histoquímicas. Outra parte desse órgão foi armazenado em papel alumínio e rapidamente acomodado em nitrogênio líquido para futura avaliação da carga parasitária por qPCR.

5.4 Avaliação histopatológica do fígado

Os fragmentos de fígado foram fixados em formol 10% tamponado pH 7,2, processados rotineiramente e embebidos em parafina para posterior corte em micrótomo. Sobre lâminas de vidro, previamente desgorduradas com álcool e posteriormente

sinalizadas, foram colocados cortes histológicos foram destinadas à avaliação histopatológica de rotina, através da coloração por hematoxilina e eosina (H&E) e avaliação de imunohistoquímica anti-*Leishmania* para avaliação do parasitismo tecidual nesses órgãos. Estes procedimentos operacionais são padrões do laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LIMP/NUPEB/UFOP), seguindo as normas de controle de qualidade do laboratório.

5.5 Avaliação semiquantitativa do fígado

Após coloração das lâminas por H&E foi realizada as análises do fígado com auxílio de microscópio de luz em aumento de 400x (Olympus Optical, Japão). Para tal, foi realizado uma análise semi-quantitativa de alterações hepáticas como degeneração hepática e inflamação portal. Após minuciosa avaliação de cada lâmina, essas alterações histológicas foram classificadas de acordo com o grau da respectiva alteração como: alteração ausente (-), alteração leve (+), alteração moderada (++) e alteração intensa (+++). Os dados foram então tabulados e posteriormente foi realizada a análise dos mesmos.

5.6 Avaliação morfométrica do fígado

O infiltrado inflamatório no fígado foi avaliado e quantificado através de 20 imagens aleatórias, em objetiva de 40x, que foram obtidas com o auxílio da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B. Todos os pixels em tons de azul foram selecionados a fim de criar um padrão que foi analisado de forma automática, o que possibilitou a quantificação das células inflamatórias através da coloração do seu núcleo. Para tal finalidade, foi utilizado o software de imagem LeicaQwin. Todos esses procedimentos foram realizados no Laboratório Multiusuário de Fotodocumentação e Morfometria do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB da UFOP.

5.7 Análise imunohistoquímica para avaliação da carga parasitária no fígado

A reação do ensaio de imunohistoquímica foi realizada de acordo com Tafuri e colaboradores (2004) com modificações. Brevemente, foi realizado bloqueio da peroxidase

endógena com peróxido de hidrogênio PA (200mL PBS 1x/ 7mL H₂O₂) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi realizado três banhos de 5 minutos de PBS e posteriormente foi adicionado soro de cabra diluído 1:100 em PBS 0,1% BSA, a fim de bloquear os sítios inespecíficos. Após serem lavadas novamente, foi adicionado anticorpo primário (soro de cão altamente reativo) diluído 1:100 em PBS 0,1% BSA, seguido de incubação overnight a 4°C. Após período de incubação, foi realizado um novo processo de lavagem, com consecutiva adição do anticorpo secundário (biotilnado) – Kit DAKO LSAB2 em quantidade suficiente para cobrir os cortes, procedendo a incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente, as lâminas foram lavadas e foi adicionada a solução de estreptoavidina – Kit DAKO LSAB2. Posteriormente, foi realizada a revelação com 50 mg diaminobenzidina (DAB), 200ml de PBS 1x, 400uL de H₂O₂. Prontamente foi realizada a contra coloração com hematoxilina diluída em água na proporção de 1:1, durante 10 min. Após secagem, as lâminas foram montadas com lamínula e Entellan.

No local da reação antígeno-anticorpo houve um depósito de um substrato cromógeno, o que possibilitou a visualização do parasito. Foi então realizada a captura de 35 imagens aleatórias (após realização de um teste de estabilidade), em aumento de 40x, de cada lâmina com o auxílio da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B e a análise foi então realizada através da marcação dessas áreas por meio do software de imagem LeicaQwin no Laboratório Multiusuário de Fotodocumentação e Morfometria do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB da UFOP.

5.8 Análise molecular para avaliação da carga parasitária no fígado

5.8.1 Extração de DNA das amostras de fígado

A partir de fragmentos de fígado, o DNA das amostras foi obtido utilizando-se o *kit* de extração WizardTM *Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA). Os procedimentos foram realizados seguindo recomendações do fabricante com modificações, conforme brevemente descrito. Fragmentos de aproximadamente 15 mg foram colocados em tubos do tipo *ependorf* (Eppendorf[®], Eppendorf AG, Alemanha) previamente identificados e adicionados 500µL de solução de lise nuclear com posterior homogeneização por inversão. Em seguida, as amostras foram submetidas a digestão 20µL de proteinase K deixando as amostras incubadas *overnight*. No dia seguinte, foram adicionados 3µL da solução de RNase

ao lisado nuclear, seguido de homogeneização e incubação em banho seco a 37°C por 30 minutos. As amostras foram resfriadas por cinco minutos a 25°C e em seguida foram adicionados 200µL da solução de precipitação proteica. As amostras foram então homogeneizadas e incubadas no gelo por cinco minutos. Em seguida foram centrifugadas a 16000 xg em microcentrífuga (Eppendorf®- Modelo 5418, NY, USA) durante cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo tipo *eppendorf*, onde se adicionou 600µL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha) e as amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos. Após este procedimento, foi realizada centrifugação a 16000 xg durante 1,5 minuto e o sobrenadante descartado. Posteriormente foram acrescentados 200µL de etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha) nas amostras as quais foram homogeneizadas e centrifugadas a 16000 xg por 1,5 minuto, sendo o sobrenadante desprezado. Finalmente, as amostras foram deixadas por 1 hora a 21-25°C para total evaporação do etanol. Em seguida, foram adicionados 100µL de solução de hidratação. As amostras foram mantidas a 21-25°C *overnight* e em seguida armazenadas em geladeira a 4°C até o momento da análise da qualidade do DNA extraído e o início da reação de PCR.

5.8.2 Extração de DNA da massa de promastigotas de *L. infantum* e construção da curva padrão

Para uma melhor otimização da curva padrão, a extração do DNA genômico dos parasitos foi realizada pelo método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), de acordo com o procedimento a seguir: 1×10^8 parasitos (cepa MCAN/BR/2008/OP46) estocados em tubos de 1,5 mL (Eppendorf®, Eppendorf AG, Alemanha) foram retirados do freezer -80°C, e após o descongelamento, foram ressuspensos em 500µL de solução de lise (SDS 1%, 5mM EDTA, 400mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8,0) que foi incubado por uma hora em banho seco a 37°C. Pela parede do tubo, foram adicionados 20µL de Proteinase K (20mg/mL - Sigma Co., EUA), seguido de homogeneização e incubação em banho seco a 55°C *overnight*. Após esse período foram adicionados 100µL de NaCl 5M e mantido por 10 minutos à 65°C e em seguida adicionaram-se 50µL de solução CTAB 10% (v/v). As amostras foram mantidas por 20 minutos a 65°C e posteriormente acrescentaram-se 400µL de clorofórmio (Sigma Co., EUA) sob agitação em *vórtex* e subsequente centrifugação a 12000xg em microcentrífuga (Eppendorf®, Eppendorf AG, Alemanha) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e adicionados 400µL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha), sendo

incubado por cerca de uma hora no freezer. Após precipitação do DNA centrifugou-se novamente por 10 minutos a 12000xg descartando o sobrenadante. Em seguida, foi efetuada a lavagem do *pellet* com etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha) gelado, homogeneização suave por inversão do tubo durante um minuto e centrifugação por 5 minutos a 12000xg com posterior descarte do sobrenadante. O precipitado remanescente foi homogeneizado em 100µL de água ultrapura autoclavada para hidratação do DNA. Após um período de aproximadamente 24 horas, 2 microlitros foram utilizados para estimar a concentração de DNA e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm no nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000®, Thermo Scientific, EUA) e o restante foi estocado em freezer a -20°C até a sua utilização na construção da curva-padrão.

Após os procedimentos descritos acima, foi construída a curva padrão para posterior amplificação por qPCR. Após eluição do *pellet* de DNA extraído em 100 µL de água purificada autoclavada, a concentração foi de 10⁶ parasitos/mL, assumindo-se que a extração foi aproximadamente 100% eficiente. A partir daí, foram realizadas diluições de forma seriada (10x), com obtenção de sete pontos na curva padrão iniciando em 10⁵ a 10⁻¹ parasitos. É importante salientar que toda placa realizada para quantificação da carga parasitária construímos uma curva padrão com sete pontos de diluição sendo cada ponto aplicado em triplicata.

5.8.3 Quantificação da carga parasitária e análise do gene constitutivo

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp*[®] *Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos - *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA) e processadas em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA).

Os controles positivos de cada placa foram as amostras diluídas de *L. infantum* utilizadas na curva padrão e como controle negativo foi usado água livre de nucleases, ao invés de DNA. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final das reações a temperatura da máquina foi elevada gradualmente até que todas as fitas duplas de material amplificado se dissociem, para a

verificação de possível contaminação dos DNA's das amostras em estudo com DNA genômico ou dímeros dos iniciadores. As reações foram realizadas utilizando-se TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, EUA); DNA (10 ng/μL); iniciadores (1 μM) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10 μL por poço. Para a quantificação do número de moléculas de DNA de *Leishmania* nas amostras, inicialmente foi determinado para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada *threshold* (Ct), calculada pelo programa *7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, EUA).

O procedimento descrito acima foi também realizado para a amplificação do gene de GAPDH, que é expresso de forma constitutiva e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade dos DNA's analisados. Para a amplificação do gene GAPDH, foram utilizados os iniciadores direto: 5' TTCCACGGCAGTCAAG 3' e reverso: 5' ACTCAGCACCATCAC 3', que amplificam um fragmento de 115pb (acesso no GenBank: AB038240). Para detecção e quantificação do parasito, foram utilizados primers que amplificam o gene de DNA polα *Leishmania infantum*. Foram utilizados os iniciadores direto: 5' AGC GCC TCA CCA CGA TTG 3' e reverso: 5' AGC GGG CAC CGA AGA GA 3', que amplificam um fragmento de 90pb (acesso no GenBank: AF009147).

Após a amplificação e obtenção do número de cópias de DNA de GAPDH de cada amostra, o menor valor obtido de Ct foi selecionado e os demais valores foram divididos por esse número. Os resultados desta razão constituíram os fatores de correção individual, que posteriormente foram multiplicados pelo número de cópias de DNA de *Leishmania* obtido para a respectiva amostra, determinando assim a carga parasitária.

A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão, gerada com quantidades conhecidas das diluições prévias das massas de promastigotas de *L. infantum* da curva padrão. Para a análise dos resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 90-110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95-0,999$). Os resultados foram expressos pelo número de amastigotas/mg de tecido.

5.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism* 8.0 (Prism Software, EUA). O teste de Kolmogorov-Smirnoff foi empregado para avaliar a distribuição amostral dos dados. Considerando os dados que não foram paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para investigar diferenças entre os grupos, acompanhado do teste de Dunns para as comparações múltiplas. Os dados que tiveram distribuição normal foram analisados pelo teste de one-way- ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Em todos os casos, foram consideradas significativas as diferenças com valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliações histopatológicas qualitativas: degeneração hidrópica e inflamação portal

Os resultados abaixo levam em consideração a análise histopatológica qualitativa, com enfoque em alterações hepáticas como degeneração hidrópica e inflamação portal nos diferentes grupos analisados.

Ambos os grupos apresentaram quadros distintos de degeneração hidrópica, sendo o grupo de cães normais (CN), o que apresentou menor grau de alterações, com 60% dos animais apresentando alteração leve e 40% apresentando ausência de degeneração hidrópica (figura 1A). Por outro lado, o grupo de cães naturalmente infectados e não tratados (INT) foi o único a apresentar animais com degeneração hidrópica intensa (14%). O restante do grupo apresentou degeneração hidrópica moderada (29%) e 57% apresentaram ausência dessa alteração, como demonstrado na figura 1A. Em relação ao grupo de cães submetidos a imunoterapia apenas com o adjuvante monofosforil lipídeo A (MPL), foi observado que 40% dos animais apresentaram ausência de degeneração hidrópica, 40% apresentaram degeneração leve e 20% apresentaram degeneração moderada (figura 1A). De forma interessante, animais do grupo submetido a imunoterapia com a vacina LBMPL (LBMPL) apresentaram um perfil semelhante ao grupo CN, com 50% dos animais tratados apresentando degeneração hidrópica leve e 50% apresentando ausência dessa alteração histopatológica (figura 1A).

Na figura 1B-I está representado um animal do grupo INT. É possível observar uma degeneração hidrópica moderada, com o animal apresentando citoplasma com aspecto granuloso e presença de vacúolos de água (demonstrado pelas setas). Já na figura 1B-II, está demonstrado um animal do grupo LBMPL, sendo possível observar uma estrutura hepática histológica normal, sem a presença de degeneração hidrópica.

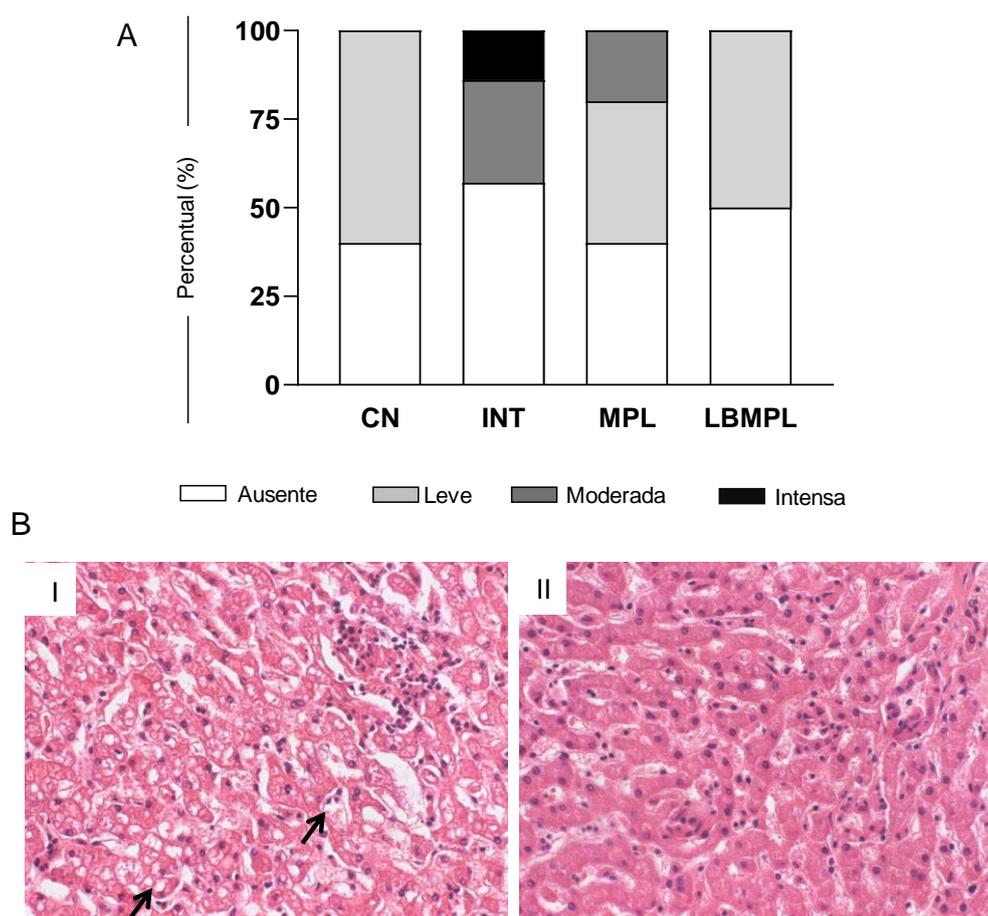


Figura 1: Avaliação histopatológica qualitativa de degeneração hidrópica no fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e tratados com a vacina LBMPL. (A) Análise qualitativa de degeneração hidrópica no fígado de cães não infectados por *L. infantum* e não tratados (CN), cães infectados e não tratados (INT), cães infectados por *L. infantum* e tratados com o adjuvante Monofosforil lipídeo A (MPL) e cães infectados por *L. infantum* e tratados com a vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante MPL (LBMPL). Os resultados são expressos na forma de percentual. As barras são codificadas da seguinte forma: branco (-), ausência de alteração; cinza claro (+), alteração leve; cinza escuro (++) , alteração moderada; preto (+++), alteração intensa. (B) Fotomicrografias representativas de presença e ausência de degeneração hidrópica no fígado de um animal do grupo INT (I) e um animal do grupo LBMPL. Coloração por hematoxilina e eosina. Imagens demonstradas no aumento de 40x. Barra=50µm.

Tendo como foco a avaliação da inflamação portal, foi possível observar que 80% dos animais do grupo CN apresentaram padrão histológico normal e 20% deles demonstraram inflamação portal leve (figura 2A). Ao contrário, animais do grupo INT apresentaram processo inflamatório portal mais expressivo, com 29% apresentando inflamação portal intensa, 14% inflamação moderada e 57% inflamação leve, como demonstrado na figura 2A. Em relação ao grupo MPL, foi possível observar que 40% dos animais apresentaram inflamação portal leve, 40% apresentaram inflamação moderada e 20% apresentaram

inflamação intensa. De forma interessante, 75% dos animais do grupo LBMPL apresentaram inflamação portal leve e apenas 25% apresentaram inflamação portal moderada (figura 2A).

Na figura 2B estão representadas imagens representativas da inflamação portal referentes aos animais dos diferentes grupos experimentais. É possível observar na figura 2B-I padrão normal com ausência de inflamação portal observado em um animal do grupo CN. Por outro lado, está demonstrada na figura 2B-II, uma intensa inflamação portal presente em um animal do grupo INT. Na figura 2B-III observamos um moderado processo inflamatório portal, representado em um animal do grupo MPL e na figura 2B-IV está demonstrado uma inflamação portal leve, presente em um animal do grupo LBMPL. O processo inflamatório portal nos diferentes grupos foi composto principalmente por células mononucleadas, principalmente linfócitos e macrófagos.

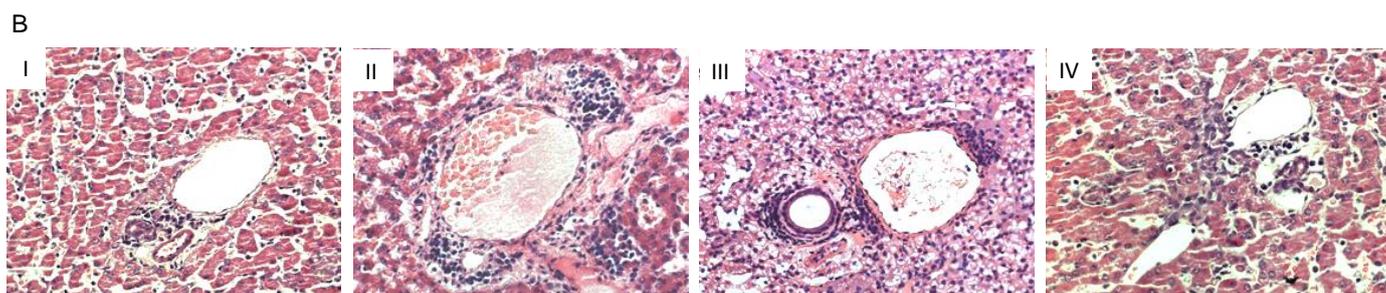
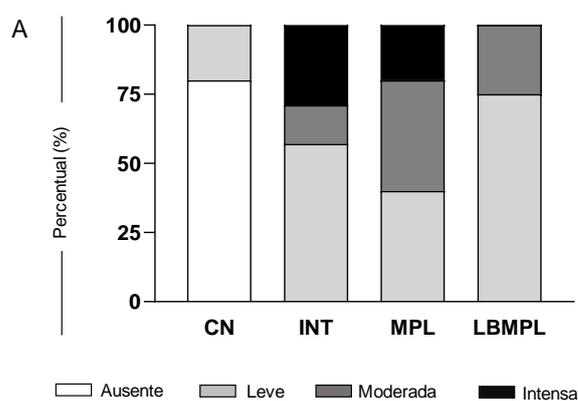


Figura 2: Avaliação histopatológica qualitativa da inflamação portal no fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e tratados com a vacina LBMPL. (A) Análise qualitativa da inflamação portal no fígado de cães não infectados por *L. infantum* e não tratados (CN), cães infectados por *L. infantum* e não tratados (INT), cães infectados por *L. infantum* e tratados com o adjuvante Monofosforil lipídeo A (MPL) e cães infectados por *L. infantum* e tratados com a vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante MPL (LBMPL). Os resultados são expressos na forma de percentual. As barras são codificadas da seguinte forma: branco (-), ausência de alteração; cinza claro (+), alteração leve; cinza escuro (++), alteração moderada; preto (+++), alteração intensa. (B) Fotomicrografias representativas do processo inflamatório portal no fígado – I: grupo CN, II: grupo INT, III: grupo MPL, IV: grupo LBMPL. Coloração por hematoxilina e eosina. Imagens demonstradas no aumento de 40x. Barra=50µm.

6.2 Avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório hepático

Para análise do processo inflamatório hepático, analisamos o número médio de células inflamatórias encontradas numa área total analisada. Neste sentido, foi possível observar um maior processo inflamatório no grupo INT em relação ao grupo CN (figura 3A). Além disso, foi observada uma redução do processo inflamatório nos grupos MPL e LBMPL em relação ao grupo INT (figura 3A). De forma interessante, foi possível observar uma diminuição da inflamação hepática no grupo LBMPL comparado ao seu grupo controle MPL, como demonstrado na figura 3A.

Na figura 3B estão demonstradas imagens histopatológicas representativas do infiltrado inflamatório hepático nos animais dos diferentes grupos experimentais. É possível observar na figura 3B-I, 3B-III e 3B-IV padrão histológico com pouca ou ausência de células. Por outro lado, está demonstrada na figura 3B-II, uma intensa inflamação no parênquima presente em um animal do grupo INT.

O infiltrado inflamatório presente em todos os grupos foi predominantemente plasmohistiocitário, com diferentes graus de intensidade, sendo esse presente na região perivascular (figura 3B-II) ou distribuído em todo órgão (figura 3B-III e IV).

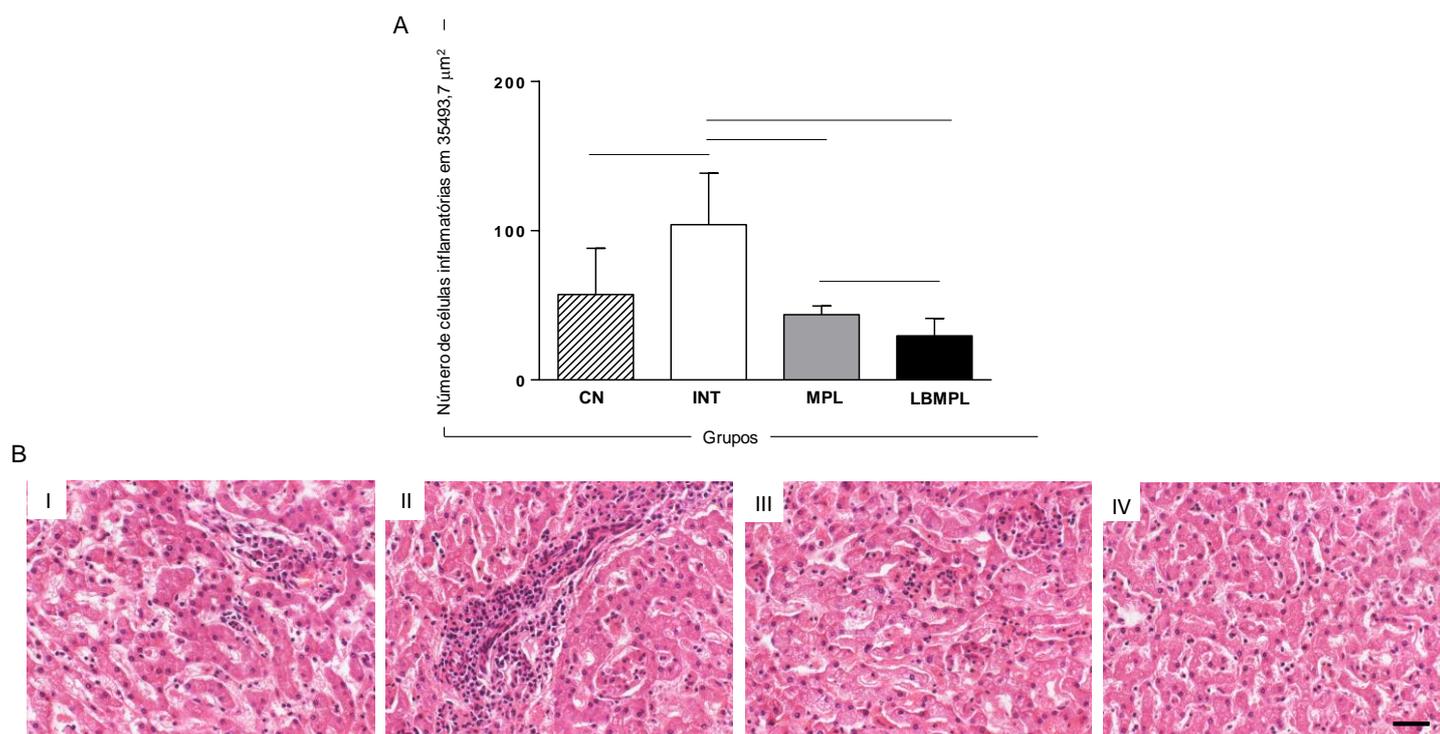


Figura 3: Processo inflamatório no fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e tratados com a vacina LBMPL. (A) Análise morfométrica do infiltrado inflamatório no fígado de cães não infectados por *L. infantum* e não tratados (CN), cães infectados por *L. infantum* e não tratados (INT), cães infectados por *L. infantum* e tratados com o adjuvante Monofosforil lipídeo A (MPL) e cães infectados por *L. infantum* e tratados com a vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante MPL (LBMPL). Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas linhas conectivas. (B) Fotomicrografias representativas do processo inflamatório no fígado – I: grupo CN, II: grupo INT, III: grupo MPL, IV: grupo LBMPL. Coloração por hematoxilina e eosina. Imagens demonstradas no aumento de 40x. Barra=50µm.

6.3 Avaliação da carga parasitária por imunohistoquímica

Após a quantificação de amastigotas imunomarcadas pela técnica de imunohistoquímica no tecido hepático, não foi possível observar diferenças significativas entre a carga parasitária nos diferentes grupos experimentais (figura 4A). Entretanto, de acordo com a figura 4A, observamos que imunoterapia com a vacina LBMPL conseguiu controlar/reduzir o parasitismo nos animais submetidos a este tratamento.

Na figura 4B é possível observar a presença de amastigotas, demonstrada pela coloração amarronzada (região imunomarcada), no tecido hepático dos diferentes grupos experimentais. Apesar de não significativo, foi possível notar que cães do grupo INT apresentaram um intenso parasitismo hepático (figura 4B-I), ao contrário do grupo LBMPL,

onde foi possível observar uma carga parasitária reduzida com menor quantidade de área imunomarcada (figura 4B-III).

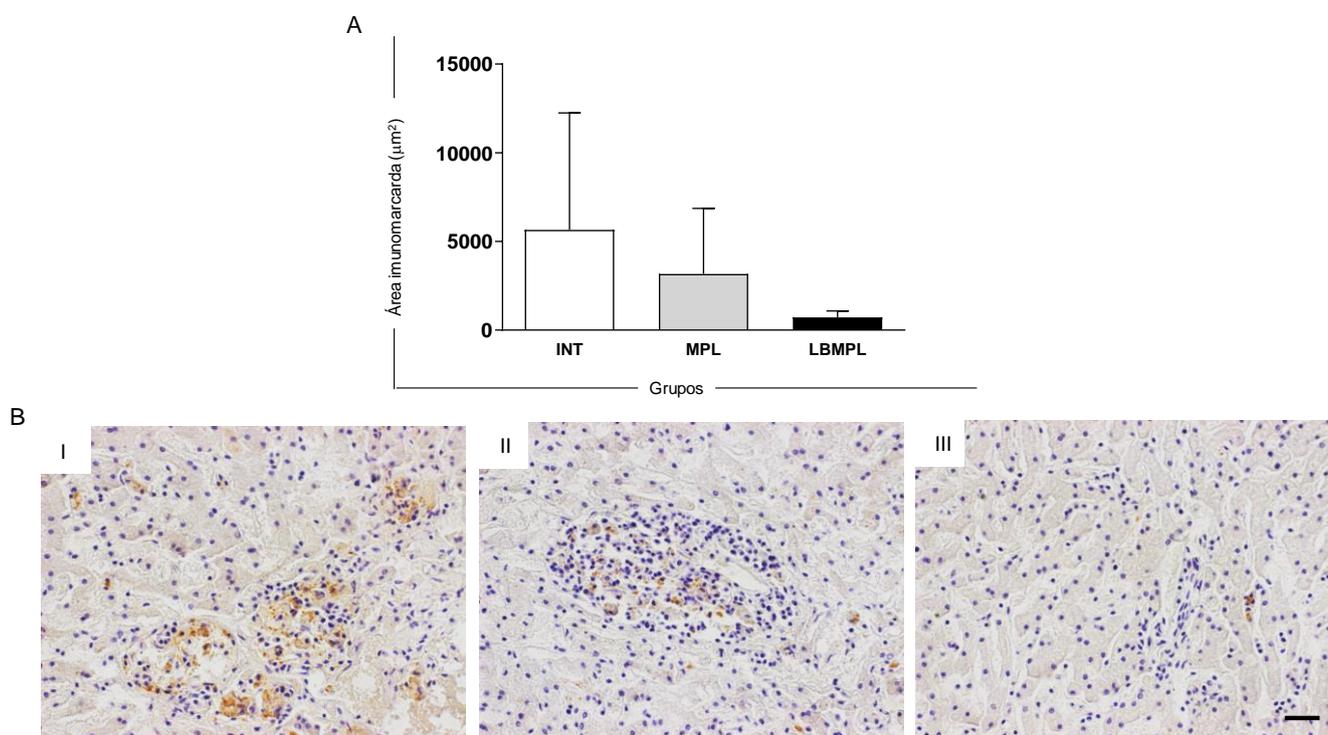


Figura 4: Avaliação da carga parasitária por imunohistoquímica anti-*Leishmania* no fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e tratados com a vacina LBMPL. (A) Imunomarcção para *Leishmania infantum* em amostras de fígado de cães infectados e não tratados (INT), cães infectados por *L. infantum* e tratados com o adjuvante Mononosforil lipídeo A (MPL) e cães infectados por *L. infantum* e tratados com a vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante MPL (LBMPL). Os resultados são expressos por média±desvio padrão. (B) Fotomicrografias representativas da imunomarcção para *Leishmania infantum* no tecido hepático, revelado com DAB e contra corado em Hematoxilina – I: grupo INT, II: grupo MPL, III: grupo LBMPL. Imagens demonstradas no aumento de 40x. Barra=50µm.

6.4 Avaliação da carga parasitaria por PCR em tempo real

Ao quantificarmos a carga parasitária hepática por PCR em tempo real, foi possível notar, de forma interessante, uma redução da carga parasitária no grupo LBMPL em relação ao grupo INT e ao grupo MPL, como demonstrado na figura 5.

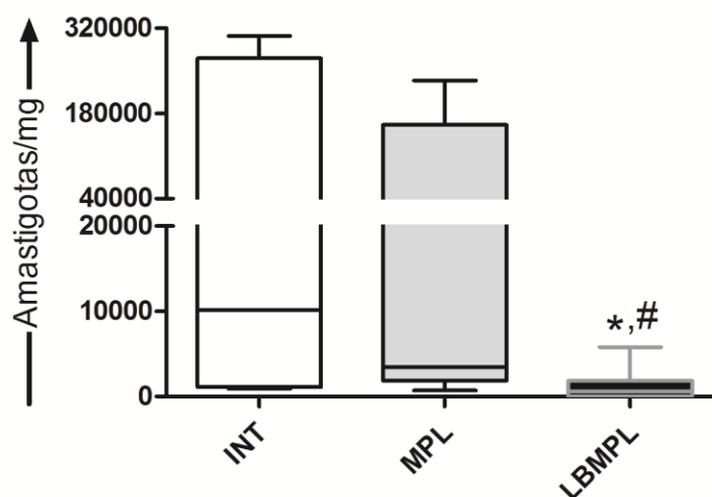


Figura 5: Avaliação da carga parasitária por PCR em tempo real no fígado de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e tratados com a vacina LBMPL. Carga parasitária em amostras de fígado de cães infectados e não tratados (INT), cães infectados por *L. infantum* e tratados com o adjuvante Mononosforil lipídeo A (MPL) e cães infectados por *L. infantum* e tratados com a vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante MPL (LBMPL). O eixo x ilustra os grupos experimentais e o eixo y representa o número de amastigotas/mg de tecido hepático. Os resultados são expressos por mediana e valor máximo e mínimo. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas por * e # relacionados aos grupos INT e MPL, respectivamente.

7. DISCUSSÃO

A LV humana assim como a LVC são doenças de grande impacto clínico e veterinário que vem ganhando destaque devido ao número alarmante de novos casos nos últimos anos. Essa endemia está relacionada com critérios socioeconômicos, climáticos, urbanos e principalmente com o ciclo evolutivo do parasito, podendo a enzootia canina preceder a ocorrência de casos humanos e ser mais prevalente que no homem (Alvar et al. 2012, WHO, 2017). Devido ao importante papel na epidemiologia da LV zoonótica, os cães são alvo de ações que visam o controle da LV no Brasil. Visando reverter esse quadro e frear o avanço da doença, o Ministério da Saúde tem como prática a mais de 60 anos, a eliminação de cães infectados como um de seus principais pilares. Nas últimas décadas, milhares de cães sororeativos foram recolhidos e eutanasiados no Brasil, porém o número de municípios com transmissão autóctone, bem como a incidência da doença humana quanto canina tem aumentado pelo país. Outro grave problema associado aos cães é o surgimento de cepas de parasitos resistentes às drogas, principalmente em regiões endêmicas onde os fármacos leishmanicidas para uso canino são utilizadas como drogas de segunda escolha para tratamento humano (Gramiccia et al. 1992; Ait-Oudhia et al. 2012).

Diante das complicações relacionadas ao controle e tratamento da LVC, estudos com enfoque em alternativas terapêuticas para os cães doentes mostram-se extremamente relevantes. Nesse sentido, a imunoterapia, tem ganhado grande destaque como alternativa de tratamento para diversas doenças, dentre as quais a LV. Assim, Roatt e colaboradores (2017) utilizaram como estratégia de imunoterapia a vacina LBMPL em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, observando resultados extremamente animadores no âmbito hemato-bioquímico, imunológico, clínico e parasitológico (medula óssea, baço e pele). No entanto, era um desejo destes pesquisadores analisarem de forma compartimentalizada os efeitos terapêuticos desta estratégia. Dessa forma, uma análise hepática foi proposta abordando aspectos histopatológicos e parasitológicos a fim de confirmar a ação terapêutica da vacina.

De uma forma geral, alterações histopatológicas no fígado em cães com LV seguem o mesmo padrão observado na doença humana e essas alterações estão associadas pela presença e/ou ação direta do parasito no tecido e pela resposta imune desencadeada pela interação parasito-hospedeiro. Dentre as principais alterações histopatológicas observadas com maior frequência no tecido hepático, destacam-se a degeneração hidrópica, a inflamação periportal

e a inflamação no parênquima (Hang et al. 1994; Giunchetti et al. 2009; Lima et al. 2017). Barros, (2011), após análise histológica do fígado de 57 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, constatou que a degeneração hidrópica pode ser mais pronunciada em cães mais debilitados clinicamente. Em nosso estudo, foi observado presença de degeneração hidrópica em todos os grupos analisados, porém em 50% dos animais tratados com a vacina LBMPL essa alteração estava ausente e nos outros se apresentava de forma leve. Tal resultado se aproxima muito do observado nos cães do grupo controle negativo, caracterizando assim uma recuperação dos hepatócitos em relação ao acúmulo hídrico. De acordo com Kumar et al. (2005), a degeneração hidrópica na LV está relacionada, principalmente, com fluxo sanguíneo prejudicado, devido ao aglomerado de células inflamatórias na região portal, o que justifica os animais tratados com a vacina LBMPL apresentarem discreta degeneração hidrópica.

Em relação ao infiltrado inflamatório portal, evidenciamos que em cães tratados com a vacina LBMPL esse parâmetro se encontrava em menores proporções, ao contrário dos cães infectados e não tratados e dos cães do grupo controle MPL, onde observamos animais com intensa inflamação portal. Em seus estudos, Giunchetti e colaboradores (2009) constataram, através de análises semi quantitativas que cães infectados por *L. infantum*, sintomáticos, apresentavam um maior processo inflamatório portal, diferentemente dos cães assintomáticos ou não tratados. Ademais, Lima e colaboradores (2017) observaram que 96% dos cães infectados por *L. infantum* avaliados em seu estudo, apresentaram inflamação no espaço porta, corroborando com os dados obtidos em nosso trabalho.

Na avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório do parênquima hepático, observamos uma redução do mesmo nos cães tratados com a vacina LBMPL, juntamente com a redução da carga parasitária nesse grupo. Corroborando com nossos dados, diferentes trabalhos na literatura têm demonstrado uma correlação positiva entre carga parasitária e inflamação em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Verçosa et al. 2008; Guerra et al. 2009; Cardoso et al. 2017). Lima e colaboradores (2019) observaram em seu estudo que todos animais sintomáticos apresentaram um infiltrado inflamatório abundante, distribuído por todo o parênquima hepático. Ademais, Barros (2011) observou que 50% dos animais sintomáticos apresentavam inflamação hepática intensa. Tais dados demonstram a importância da imunoterapia empregada, uma vez que os cães do nosso estudo também eram sintomáticos, no entanto, esse processo inflamatório foi extremamente reduzido. Provavelmente está normalização do processo inflamatório pode estar associado a

redução da carga parasitárias tecidual e o *clearance* hepático em relação a presença de formas amastigotas do parasito.

Em relação à composição do infiltrado inflamatório presente no fígado, foi possível observar que este era composto por células mononucleares com predomínio de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, respectivamente, presentes no parênquima e em focos ao redor do espaço porta e de vasos sanguíneos. Apesar da presença de macrófagos ser alta, estes não formavam granulomas. Ao contrário do que foi observado por nós, Tafuri e colaboradores (1996, 2004) classificaram a presença de granulomas hepáticos como uma das alterações histológicas mais marcantes da LVC, sendo a gravidade das lesões determinada por variações individuais de cada animal. Outros estudos postulam que a formação de granulomas muitas vezes está relacionada com a contenção do parasito e da infecção (Murray 2001; Lemos et al. 2000). Castro (2012) associou a formação de granulomas na LVC como um mecanismo de defesa e controle da proliferação do parasito, uma vez que os cães infectados e assintomáticos apresentaram granulomas. Em nosso estudo, os mesmos não foram observados. Essa ausência pode estar relacionada com a cronicidade da infecção uma vez que os cães utilizados neste estudo poderiam estar em uma fase crônica mais recente não apresentando tempo hábil para a formação das alterações tipo granulomas, observadas na LVC.

Atualmente, existem diversas metodologias para o diagnóstico de LVC. Em suma, elas se baseiam na detecção do parasito em amostras de baço, fígado e medula óssea (MS, 2014). Porém em alguns órgãos essa detecção é difícil, não sendo possível identifica-los por meio da imunohistoquímica ou através de análises histopatológicas (Tafuri, et al. 2001). Dessa forma, técnicas mais robustas como a PCR convencional e a PCR em tempo real tem se tornado ferramentas robustas e fundamentais para detectar a presença do parasito, além de monitorar a carga parasitária e consequentemente a evolução da LV e também da LVC (Bretagne et al. 2001; Manna, et al. 2006; Roatt et al. 2017).

Em suas pesquisas por método mais precisos e sensíveis, Tafuri e colaboradores (2004) visando simplificar a técnica de imunohistoquímica, utilizaram soro de cães naturalmente infectados por *L. infantum* como anticorpo primário, por este ser mais acessível e de elevada reatividade. Tal técnica se apresentou com grande potencial para estudos epidemiológicos, clínicos e histopatológicos da LVC. No entanto, o que se tem observado é uma baixa sensibilidade e especificidade da técnica, o que limita bastante seu uso atualmente. Em nosso estudo, a imunohistoquímica foi capaz de detectar a presença do parasito em 100% das

amostras. Entretanto, observamos que a área imunomarcada em cães submetidos à imunoterapia com LBMPL foi bastante reduzida. Dessa forma, assim como observamos nos achados histopatológicos, um padrão de normalização pode estar associado a redução drástica da carga parasitária promovida pela ação terapêutica da vacina LBMPL nos animais.

Queiroz e colaboradores (2009), analisaram as técnicas de qPCR, imunohistoquímica e testes sorológicos, com a finalidade de avaliar qual a melhor técnica para o diagnóstico de LVC. Esses autores constataram que 87% dos cães assintomáticos, apresentavam um resultado falso negativo para LVC pelos testes sorológicos. No entanto 50% destes eram diagnosticados como positivos no teste de imunohistoquímica e 100% destes cães foram positivos pela técnica de qPCR, o que demonstrou a variabilidade dos testes diretamente associado à carga parasitaria dos animais, fazendo-se necessário, em muitos casos, a combinação das técnicas sorológicas e parasitológicas para um melhor diagnóstico final. Avaliando tecidos como baço e pele, Reis e colaboradores (2013), buscaram distinguir entre as diferentes metodologias de PCR, qual a mais qualificada para analisar carga parasitaria, em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Nesse estudo os autores constataram que a opção mais apropriada era a qPCR, devido a elevada sensibilidade.

Assim sendo, no presente estudo, combinamos as técnicas de imunohistoquímica e qPCR, a fim de obter um resultado mais robusto. Através da técnica de imunohistoquímica não observamos diferenças significativas na carga parasitária dos diferentes grupos experimentais, apesar dessa ter sido menor no grupo LBMPL. Da mesma forma, Castro (2012), apesar de observar um maior número de células parasitadas no fígado de cães sintomáticos por imunohistoquímica, essa não foi estatisticamente diferente de cães assintomáticos. Quando utilizamos a técnica de qPCR, observamos que o grupo de cães submetidos a imunoterapia com LBMPL apresentou uma menor carga parasitária hepática quando comparado ao grupo INT e MPL. Duas questões principais estão associadas a este resultado: a ação terapêutica da vacinoterapia, estimulando a resposta imune do hospedeiro para controle/combate ao parasitismo e a sensibilidade da técnica que foi capaz de detectar, de forma mais ampla, as diferenças na carga parasitária entre os grupos estudados. Em outros tecidos como medula óssea e pele, Roatt e colaboradores (2017), também observou que o uso da qPCR é de extrema importância para detectar a presença do parasito em animais submetidos à imunoterapia pois utilizando o isolamento do parasito em meios de cultura (NNN/LIT), as amostras em sua maioria dão resultado negativo.

Diante de tais fatos, o presente estudo se mostrou relevante, demonstrando que a redução da carga parasitária hepática no grupo de cães tratados com a vacina LBMPL foi favorável à redução da ocorrência de diversas alterações teciduais como degeneração hidrópica dos hepatócitos, bem como redução na intensidade do infiltrado inflamatório portal e do parênquima. Assim, demonstramos uma melhora histopatológica e parasitológica no fígado dos cães tratados corroborando com os bons resultados já obtidos em relação aos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos observados por Roatt e colaboradores (2017). Dessa forma, evidenciamos em nosso trabalho a importância da imunoterapia com a vacina LBMPL em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, uma vez que a mesma se mostra efetiva diante dos parâmetros e técnicas analisadas, despontando assim como uma potencial arma terapêutica a ser aplicada como proposta de tratamento na LVC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AÏT-OU DHIA, K. et al. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Veterinary parasitology*, v. 187, n. 3-4, p. 386-393, 2012.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012.

ALVAR, J. et al., Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*, v. 57, n. 3, p. 1-88, 2004.

BAGUES, N. C. T; et. al, Parasitic load and histological aspects in different regions of the spleen of dogs with visceral leishmaniasis. *Revista Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. v. 56, p. 14-19, Fevereiro, 2018.

BANETH, G. et al., Leishmaniose canina - novos conceitos e insights sobre uma zoonose em expansão: primeira parte. *Tendências em parasitologia*, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BARROS, Rafaela Magalhães. Caracterização histopatológica da Leishmaniose Visceral Canina no Distrito Federal. Dissertação de Mestrado em saúde animal. DF, Brasília, 2011.

BORGES, B. K. A. et al., Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais Animal presence and the risk for transmission of visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 5, p. 1035-1043, 2009

BRETAGNE, S. et al. Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in Infected Mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 8, n. 4, p. 828-831, 2001.

CARDOSO, Jamille Mirelle de Oliveira. Tratamento da leishmaniose visceral canina empregando duas abordagens terapêuticas distintas: quimioterapia com antimoniato de megluminalipossomal e imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. 2018. Tese de doutorado. Universidade Federal de Ouro Preto

CASTRO, I. P. et al. Lesões hepáticas na leishmaniose visceral canina: aspectos histopatológicos e bioquímicos. 2012.

CAVALCANTI, Amanda dos Santos. Leishmaniose visceral canina: correlação da resposta imunológica com a carga parasitária e a variabilidade genética do parasita. 2014. Tese de Doutorado.

Da Silva AVA, et al. Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of *Leishmania infantum*-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. *Revista PLoSNeglTropDis*, Canadá, v. 12, n 4, p. 0006445-0006461, Abril, 2018.

DE QUEIROZ, Nina MGP et al. Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISA-test. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

DUJARDIN, et. al., Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging infectious diseases*, v. 14, n. 7, p. 1013, 2008.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 121, n. 1-2, p. 23-33, 2009.

GIUNCHETTI, R. C. et al., Histopathologica landimmuno histochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitismo and sérum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in veterinaryscience*, v. 84, n. 2, p. 269-277, 2008.

GIUNCHETTI, R. C. et. al., Influência do parasitismo sobre os aspectos imunopatológicos na leishmaniose visceral canina (Dissertação de Mestrado em Imunoparasitologia). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 101p, 2004.

GRAMICCIA M. et al. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drugtreatment. *Ann Trop Med Parasi-tol*. 1992; 86: 613–620.

GUERRA, J. M. et al. Evaluation of immunohistochemical technique for the diagnosis of *Leishmania* spp. in canine tissues samples. *R. Inst. Adolfo Lutz*, p. 01-10, 2016.

KUMAR, V. et al. Adaptação, dano e morte celular. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins & Cotran (eds.). *Bases patológicas das doenças*, v. 7, p. 17-9, 2005.

LEMOS, S.V. et al. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological response in CBA mice. *Microbes and Infection*, v.15, p.1807-1815.

LIMA, Isadora dos Santos. Patologia da Leishmaniose Visceral Canina: ênfase no significado da resposta inflamatória granulomatosa no fígado. 2017. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

LIMA, Isadora S. et al. Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, v. 12, n. 1, p. 487, 2019.

LIMA, W. G. et al. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 117, n. 1-2, p. 129-136, 2007.

MACHADO, P. et al. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. *Saúde e Sociedade*, v. 25, p. 247-258, 2016.

MANNA, Laura. et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 142, n. 3-4, p. 271-280, 2006.

MARTINS, D. et al., Alterações da matriz extracelular esplênica em cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*. *Ciência Animal Brasileira*, v. 16, n. 1, p. 103-115, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos, v. 1, 2014.

MOORE, et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001.

MOREIRA, Pamela Rodrigues Reina. Resposta imune diferenciada no fígado e no baço de cães com leishmaniose visceral. 2013. xii, 66 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2013.

- MURRAY, et. al., Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infection and immunity*, v. 70, n. 11, p. 6284-6293, 2002.
- MURRAY, Henry W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *International journal of experimental pathology*, v. 82, n. 5, p. 249-267, 2001.
- NOLI, C. et al. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary dermatology*, v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.
- QUEIROZ, N. M. G. P. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, jan.-mar. 2010
- REIS, A. B. et al., Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.
- REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.* 146, 303-311, 2006.
- REIS, L. E. S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Veterinary parasitology*, v. 197, n. 3-4, p. 498-503, 2013.
- ROATT, B. M. Avaliação de uma vacina terapêutica (LBMPL) no tratamento da leishmaniose visceral utilizando o cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum* como modelo experimental. 2013. 170f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
- ROATT, Bruno Mendes et al. A vaccine therapy for canine visceral leishmaniasis promoted significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite burden. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 217, 2017.
- SALZO, P. et al., Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. *Nosso clínico*, São Paulo, ano 11, n.63, p.30-34, 2008.
- SANTIN, F. et. al., Acompanhamento laboratorial da função renal de cães saudáveis tratados experimentalmente com doses terapêuticas de anfotericina B. *Ciência Rural*, p. 1816-1823, 2006.

Secretaria de vigilância em saúde. II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC). Acessado em seis de setembro de 2019

SILVA, Luísa Mariano Cerqueira da. Estudo de lesões hepáticas em cães e gatos e intoxicações em felinos. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary parasitology*, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors*, v.4, p.86, 2011.

TAFURI, W. L., et al. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* V.38, p 81-89, 1996.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary parasitology*, v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001.

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

VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC veterinary research*, v. 4, n. 1, p. 45, 2008.

World Health Organization - WHO. Disponível em:

<http://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>. Acessado em 07 setembro de 2019.