

LUCIANA GHINATO

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E MARCAÇÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA DO PARASITISMO NO INTESTINO DE CÃES (*Canis
familiaris*) (Linnaeus, 1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR
Leishmania (Leishmania) infantum (Nicolle, 1908)**

RECIFE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

LUCIANA GHINATO

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E MARCAÇÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA DO PARASITISMO NO INTESTINO DE CÃES (*Canis
familiaris*) (Linnaeus, 1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR
Leishmania (Leishmania) infantum (Nicolle, 1908)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia

Recife
2011

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E MARCAÇÃO IMUNO-
HISTOQUÍMICA DO PARASITISMO NO INTESTINO DE CÃES (*Canis
familiaris*) (Linnaeus, 1758) NATURALMENTE INFECTADOS POR
Leishmania (Leishmania) infantum (Nicolle, 1908)**

Dissertação de Mestrado defendida por:

LUCIANA GHINATO

Aprovada em 28/02/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dra. Beatriz Berlinck d'Utra Vaz

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dra. Nair Silva Cavalcanti de Lira

Médica Veterinária

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

John Ruskin

A meu pai tão amado, Aldo Ghinato...

“Sei que estás me guardando de onde estiver”.

In memória

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Frederico Celso Lyra Maia, meu orientador, pela humildade, solicitude, conhecimento, respeito e principalmente amizade demonstrados no decorrer deste trabalho, fundamentais para o meu crescimento profissional e científico.

Ao Professor Leucio Câmara Alves, meu co-orientador, cuja competência, respeito ao próximo e incentivo constantes, o tornam um grande exemplo a ser seguido.

Aos meus amigos e companheiros Sandra Maria, Danilo, Edna e todos os demais do Laboratório de Doenças Parasitária da UFRPE, pela grande ajuda, amizade e apoio, imprescindíveis na realização deste trabalho.

Ao Professor Wagner Luis Tafuri, pela gentileza de me receber no Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais.

À Maria Marta, pela paciência e inestimável ajuda na realização da imuno-histoquímica e das análises estatísticas.

À Vânia, pela ajuda na confecção das lâminas de imuno-histoquímica.

À Simone, pela ajuda na confecção das lâminas de histopatologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Centro de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde de Petrolina, pela permissão da colheita de materiais.

Aos parentes, amigos, residentes, mestrandos e docentes que me ajudaram, direta ou indiretamente, a concluir este projeto.

A todos, minha sincera gratidão.

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 1 – Frequência relativa (FR) e absoluta (FA) dos sinais clínicos dos animais com Leishmaniose Visceral Canina (LVC) provenientes do município de Petrolina, PE, 2010. 26

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1.a- Jejuno de cão naturalmente infectado com <i>L. (L.) infantum</i> . Inflamação linfohistioplasmocitária na mucosa (seta amarela), muscular da mucosa (seta preta) e submucosa (seta vermelha). HE 220X	30
Figura 1.b- Jejuno de cão naturalmente infectado com <i>L. (L.) infantum</i> . Macrófagos (seta amarela) e plasmócitos (seta preta). HE 440X	30
Figura 1.c- Ceco de cão naturalmente infectado com <i>L. (L.) infantum</i> . Inflamação linfohistioplasmocitária na mucosa (seta amarela). HE 220X	30
Figura 1.d- Ceco de cão naturalmente infectado com <i>L. (L.) infantum</i> . Macrófagos ativados parasitados com formas amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> (seta amarela). HE 440x	30
Figura 2.a- Jejuno de cão naturalmente infectado com <i>L. (L.) infantum</i> . Imunomarcação positiva de formas amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> (seta amarela) pelo método imuno-histoquímico em Estreptoavidina-Peroxidase. IHQ 440X	32
Figura 2.b- Jejuno de cão naturalmente infectado com <i>L. (L.) infantum</i> . Imunomarcação positiva de formas amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na mucosa (seta amarela) e entre as vilosidades (seta vermelha) pelo método imuno-histoquímico em Estreptoavidina-Peroxidase (seta vermelha) IHQ 440X	32
Figura 2.c- Ceco de cão naturalmente infectado com <i>L. (L.) infantum</i> . Imunomarcação positiva de formas amastigotas <i>L. (L.) infantum</i> na mucosa (seta amarela) pelo método imuno-histoquímico em Estreptoavidina-Peroxidase (seta vermelha) IHQ 440X	32
Figura 2.d- Ceco de cão naturalmente infectado com <i>L. (L.) infantum</i> . Imunomarcação positiva de formas amastigotas <i>L. (L.) infantum</i> na mucosa (seta amarela) e na submucosa (seta vermelha) de pelo método imuno-histoquímico em Estreptoavidina-Peroxidase. IHQ 440X	32
Figura 3- Comparação da carga parasitária entre todos os segmentos do trato intestinal avaliados de oito cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) infantum</i> positivos pela imuno-histoquímica.	33
Figura 4- Comparação da reação inflamatória entre os segmentos do trato intestinal de oito cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) infantum</i> positivos pela imuno-histoquímica.	34

Figura 5- Comparação entre carga parasitária e reação inflamatória em todos os segmentos do trato intestinal de oito cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* positivos pela imuno-histoquímica. 34

Figura 6- Correlação entre parasitismo e inflamação em oito cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* positivos pela imuno-histoquímica. 35

Lista de Abreviaturas

BSA	Solução de Albumina Bovina
CVA	Centro de Vigilância Ambiental
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidina
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HE	Hematoxilina Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-	Interferon
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucinas
Kg	Quilogramas
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
mg	Miligrama
ml	Mililitro
PBS	Phosphate Buffer Saline
TI	Trato Intestinal
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Th1	Linfócito Helper Tipo 1
Th2	Linfócito Helper Tipo 2
TGF-beta	Fator de Crescimento Transformador Beta
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
%	Porcentagem
pH	Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Leishmaniose Visceral	17
2.2 Leishmaniose Visceral Canina	17
2.3 Imunologia do Trato Intestinal	18
2.4 Imunopatologia da Leishmaniose Visceral Canina	20
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Animais	23
4.2 Exame Clínico	23
4.3 Necropsia	23
4.4 Macroscopia	24
4.5 Microscopia	24
4.6 Avaliação Imuno-Histoquímica pela Estreptoavidina-Peroxidase para Detecção de Formas Amastigotas de <i>Leishmania</i> sp.	24
4.7 Análise Estatística	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Exame Clínico	26
5.2 Análise Macroscópica	27
5.3 Análise Microscópica	27
5.3.1 Avaliação Histopatológica	27
5.3.2 Avaliação Imuno-Histoquímica	31
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS	37
8. APÊNDICE	43
8.1 APÊNDICE 1 - Tabela 2. Alterações Inflamatórias Encontradas nos Segmento do Intestino Delgado e Grosso de Cães Naturalmente	

Infectados por <i>Leishmania infantum</i> .	44
8.2 APÊNDICE 2 - Tabela 3. Alterações Circulatórias Encontradas nos Segmento do Intestino Delgado e Grosso de Cães Naturalmente Infectados por <i>Leishmania infantum</i> .	45
9. ANEXOS	46
9.1 ANEXO 1 - Protocolo de Imuno-Histoquímica pela Reação Streptavidina-Peroxidase	47
9.2 ANEXO 2 - Diluições Utilizadas para Imuno-Histoquímica	49

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é numa doença parasitária que se caracteriza por possuir sintomatologia embora alguns casos sejam assintomáticos. Poucos estudos sobre o parasitismo por *Leishmania* sp. no trato intestinal de cães tem sido realizados. O objetivo desta pesquisa foi avaliar as alterações estruturais e a detecção imuno-histoquímica da *Leishmania (Leishmania) infantum*, através de amostras de intestino canino fixadas em formalina e embebidas em parafina. Fragmentos de intestinos de 36 cães com exames sorológicos e parasitológicos positivos para *L. (L.) infantum* foram obtidos e analisados através da histopatologia (Coloração por H.E.) e análise imuno-histoquímica (streptoavidina-peroxidase). Nenhuma alteração macroscópica foi observada. A avaliação histopatológica entretanto revelou infiltrado linfohistioplasmocitário em 88,88% (32/36) dos duodenos, 86.11% (31/36) dos jejunos, 97.22% (35/36) dos íleos, 91.66% (33/36) dos cecos, 86.11% (31/36) dos cólons e 72.22% (26/36) dos retos, particularmente observados na mucosa, submucosa e muscular da mucosa. Alterações circulatórias como hiperemia, hemorragia e congestão foram encontradas em 66.66% (24/36) dos duodenos, 69.44% (25/36) dos jejunos, 69.44% (25/36) dos íleos, 77.77% (28/36) dos cecos, 80.55% (29/36) dos cólons e 77.77% (28/36) dos retos. Formas amastigotas de *L. (L.) infantum* foram detectadas através da streptoavidina-peroxidase em fragmentos de ambos dos intestinos delgado e grosso em 22,22% (8/36) dos cães analisados.

Palavras-chave: Canino, digestivo, histopatologia, imunomarcção

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a parasitic disease characterized by a clinical or asymptomatic disease. Although few studies of parasitism of *Leishmania* sp in intestinal tract in dogs have been undertaken. The goal of this research was to evaluate the structural changes and the Immunohistochemical detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine intestines. Fragments of intestines from 36 dogs with a positive parasitological and serological exams for *L. (L.) infantum* were obtained and analyzed by histopathology (Hematoxylin and Eosin stain -HE) and immunohistochemistry assays (strepto-avidin -peroxidase). No macroscopic changes were found. Histopathological evaluation showed lymphohistiocytic- plasmocytes infiltrates in 88.88% (32/36) of duodenum, 86.11% (31/36) of jejunum, 97.22% (35/36) of ileum, 91.66% (33/36) of cecum, 86.11% (31/36) of colon and 72.22% (26/36) of rectum section, particularly in the mucous membrane, submucosa and *muscularis mucosae*. The circulatory changes as hyperemia, hemorrhages and congestion were found in 66.66% (24/36) of duodenum, 69.44% (25/36) of jejunum, 69.44% (25/36) of ileum, 77.77% (28/36) of cecum, 80.55% (29/36) of colon and 77.77% (28/36) of rectum fragments. Amastigotes forms of *L. (L.) infantum* were detected by strepto-avidin-peroxidase in from both small and large intestine fragments (22.22%).

Keywords: Canine, digestive, histopathology, immunostainin

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é endêmica em 65 países, com registro anual de mais de 90% dos 500 mil casos novos concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil (DAVIDSON, 1999; ALVAR et al., 2004; DESJEUX, 2004).

Nas Américas, cerca de 90% dos casos humanos de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) têm sido registrados no Brasil (MILES et al., 1999; DESJEUX, 2002; ALVES, 2006) atingindo Estados como Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí, Maranhão, Tocantins, Pará, Roraima, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (LAINSON e RANGEL, 2005). Não obstante, a doença ocorre predominantemente na região Nordeste, sendo os Estados mais acometidos a Bahia, Ceará, Piauí, Maranhão e Pernambuco (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; DESJEUX, 2002).

Nas Américas, a Leishmaniose Visceral (LV) é causada pelo protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; MILES et al., 1999; FEITOSA, 2006) sendo transmitida ao homem e ao cão pela picada dos insetos do gênero *Lutzomyia*, sendo o cão o principal reservatório da doença no ambiente urbano (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; POCAI et al., 1998; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000; BLAVIER et al., 2001; IKEDA et al., 2003; LANGONI et al., 2005).

Sendo assim, em áreas endêmicas os cães podem ser encontrados sintomáticos, ou assintomáticos, dificultando o diagnóstico e as medidas de controle (ALVAR et al., 2004; DESJEUX, 2004) A infecção humana é clinicamente semelhante à doença canina, entretanto os cães com sintomatologia típica além do comprometimento visceral, tais como baço, medula óssea, fígado, rins (TAFURI et al., 1989; SANTOS-GOMES et al., 2000; FEITOSA, 2006; LUVIZOTTO, 2006), também apresentam lesões de pele (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; SANTOS-GOMES et al., 2000; KRAUSPENHAR et al., 2007; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008).

Contudo, outras formas clínicas atípicas podem estar presentes incluindo os distúrbios cardíacos, respiratórios, neurológicos e digestivos (SLAPPENDEL, 1988; FERRER, 1999; VINUELAS et al., 2001; SILVA et al., 2002; LUVIZOTTO, 2006; FERRARI et al., 2006).

Em relação ao trato gastrointestinal é possível observar cães com quadros de diarreia crônica e enterite hemorrágica (FERRER et al., 1991; DENEROLLE, 1996; FEITOSA, 2001;

CIARAMELLA e CORONA, 2003; FEITOSA, 2006). Segundo Ferrer et al (1991) e Luvizotto (2006) o envolvimento do trato gastrointestinal nos cães pode ser resultante da reação inflamatória desencadeada pela ação local do parasito, onde estes autores observaram hiperemia difusa e focos de erosão na mucosa do cólon.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações estruturais e marcação imuno-histoquímica do parasitismo no intestino de cães, naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose com ampla distribuição geográfica em países de clima tropical ou subtropical (SLAPPENDEL, 1988; DAVIDSON, 1999; DERREURE et al., 1999; BLAVIER et al., 2001; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008).

Nas Américas a LV ocorre em aproximadamente 24 países, sendo o homem considerado hospedeiro acidental no ciclo de vida das várias espécies do parasito, que inclui ainda como hospedeiro invertebrado, fêmeas dos insetos flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* e como hospedeiros vertebrados canídeos, marsupiais e roedores, dentre outros (GRIMALDI e TESH, 1993; NOLI, 1999; DESJEUX, 2004).

A LV é uma doença de ambientes silvestres ou rurais, entretanto, as transformações ambientais provocadas pelo intenso processo migratório e o processo de urbanização crescente levaram a expansão das áreas endêmicas, com o aparecimento de novos focos, apontando a enfermidade como uma doença reemergente (CASTRO, 1996; ALVES e BEVILACQUA, 2004).

É uma doença de caráter parasitário que acomete os principais órgãos e que pode ser fatal se não tratada, pois o hospedeiro falha em estabelecer uma resposta protetora eficiente contra o parasita (SILVA, 2007).

2.2 Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença que passou a constituir um grave problema de Saúde Pública (REICHMANN, 2006), visto que os cães tornaram-se o reservatório mais importante na área urbana (COSTA et al., 1999; MILES et al., 1999; ASHFORD, 2000; REICHMANN, 2006; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008).

A *L. (L.) infantum* têm duas fases distintas no seu ciclo de vida, uma fase com forma promastigota flagelada e móvel que vive extracelularmente no trato digestivo dos

flebotomíneos e uma fase com forma amastigota imóvel que reside no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado (GRIMALDI e TESH, 1993).

A *Leishmania* sp. é parasito intracelular obrigatório, e quando os parasitos são inoculados na pele do hospedeiro pelos flebótomos, invadem os macrófagos e neles se multiplicam. Dependendo da resposta imune do hospedeiro frente ao agente, a *Leishmania* sp. pode se disseminar nos macrófagos para outros órgãos, tais como baço, medula óssea, fígado (SANTOS-GOMES et al., 2000; FEITOSA, 2006; LUVIZOTTO, 2006), coração, pulmão, intestinos e rins (TAFURI et al., 1989; TAFURI et al., 2001; SILVA et al., 2002; FERRARI et al., 2006; LUVIZOTTO, 2006; BANETH et al., 2009).

A LVC é uma doença crônica, sistêmica e fatal, sendo os principais sinais clínicos representados por caquexia, anemia (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; CIARAMELLA e CORONA, 2003; LANGONI et al., 2005; KRAUSPENHAR et al., 2007; BANETH et al., 2009), alterações dermatológicas (SLAPPENDEL, 1988; FERRER, 1999; FEITOSA et al., 2000; FEITOSA, 2001; FEITOSA, 2006; MELO et al., 2008; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008; BANETH et al., 2009) e onicogribose (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; FEITOSA et al., 2000; CIARAMELLA e CORONA, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008).

Sinais clínicos inespecíficos como diarreia crônica e melena (GONZALES, et al., 1990; FERRER et al., 1991; FERRER, 1999; BLAVIER et al., 2001; FEITOSA, 2001; SILVA et al., 2001; AZEVEDO et al., 2003; CIARAMELLA e CORONA, 2003; LUVIZOTTO, 2006; KRAUSPENHAR et al., 2007), alterações oftalmológicas (GARCIA-ALONSO et al., 1996; FERRER, 1999; CIARAMELLA e CORONA, 2003; BRITO et al., 2006; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008; BANETH et al., 2009), epitaxe (FERRER, 1999; CIARAMELLA e CORONA, 2003; BANETH et al., 2009), alterações neurológicas (VINUELAS et al., 2001) e distúrbios respiratórias (LUVIZOTTO, 2006) têm sido relatados em cães com infecção por *L. (L.) infantum*.

2.3 Imunologia do Trato Intestinal

A barreira da mucosa intestinal possui uma enorme superfície composta por uma variedade de elementos celulares e não-celulares. Estruturalmente, a barreira é formada

por um revestimento de células epiteliais e tecidos linfóides organizados e projetados para auxiliar na função de proteção contra antígenos estranhos prejudiciais (ACHESON e LUCCIOLI, 2004).

O sistema imune local do trato gastrointestinal pode ser subdividido em distintos compartimentos: linfócitos intra-epiteliais, lâmina própria, folículos linfóides isolados na lâmina própria, folículos linfóides agregados como placas de Payer (no íleo) e linfonodos de drenagem da parede intestinal. Este tecido linfático associado ao trato digestivo é denominado de GALT (Tecido Linfóide Associado ao Digestivo) (KRAEHENBUHL e NEUTRA, 2000; ANDERSON, 2001; JUNQUEIRA et al., 2004; SCHENK e MUELLER, 2008).

A lâmina própria contém principalmente um enorme número de células B diferenciadas e secretoras de IgA, células T, células dendríticas, macrófagos, mastócitos e polimorfonucleares (ANDERSON, 2001; BRANDTZAEG, 2002; SCHENK e MUELLER, 2008). Embora a apresentação do antígeno também ocorra, este compartimento oferece importantes sítios efetores para impedir a entrada e disseminação sistêmica de agentes patogênicos através da barreira de células intestinais e para a destruição de patógenos, quando ocorre a invasão (BRANDTZAEG, 2002).

Os linfócitos da lâmina própria são principalmente os plasmócitos secretores de IgA da linhagem de células B e células T efetoras. As células T efetoras incluem dois tipos de células T auxiliares (Th), principalmente as células CD4+ e células CD8+ que têm funções citotóxicas, mas que podem também elaborar respostas efetoras (ACHESON e LUCCIOLI, 2004).

Macrófagos, células dendríticas e células epiteliais fagocitam amostras de antígenos e os apresentam às células T. Respostas de células Th1 ocorrem em ambientes onde a IL-12 é liberada por estas células apresentadoras de antígenos. IL-12 é conhecida como indutora de células “natural killer” de função citotóxica e induz células Th1 para produção de interferon-gama (INF-g). INF-g é importante para mediação da resposta celular e para induzir macrófagos a eliminar patógenos intracelulares pela via do óxido nítrico. Outras citocinas importantes são a IL-2 e o fator de necrose tumoral (TNF-a), que ativam macrófagos e IL-8 que recruta outros fagócitos, como os neutrófilos. Tradicionalmente as células Th2 respondem a agentes multinucleares, sendo secretadas outras citocinas IL-4, IL-5 e IL-3 para induzir a ativação e diferenciação das células B para produção de imunoglobulinas e recrutamento de

eosinófilos e mastócitos para os tecidos (ACHESON e LUCCIOLI, 2004; SCHENK e MUELLER, 2008).

As placas de Payer são agregados de nódulos linfóides semelhantes em muitos aspectos aos linfonodos; são localizadas na mucosa e se estendem até a submucosa de todo o intestino delgado, especialmente no íleo. Pequenos nódulos linfóides podem ser encontrados em todo o trato intestinal (ANDERSON, 2001; JUNQUEIRA et al., 2004). São caracterizadas por agregados de células B imaturas e células auxiliares T CD4+ dentro de locais específicos das células M (KRAEHENBUHL & NEUTRA, 2000). Assim, estes agregados linfóides entram em contato apenas com antígenos do lúmen intestinal e servem como locais de indução de resposta imune intestinal (BRANDTZAEG, 2002). Outra característica única destes tecidos linfóides é a propensão para a produção de IgA. As células dendríticas das placas de Payer produzem IL-10, que polariza células T virgens para Th auxiliar tipo Th₂ e induz diferenciação dos plasmócitos para produção de IgA (UEMATSU et al., 2008).

2.4 Imunopatologia da LVC

A LVC pode apresentar-se como infecção aguda ou crônica, dependendo da interação entre o agente etiológico e o hospedeiro. Após infecção por *Leishmania* sp, esta pode se disseminar nos macrófagos (SANTOS-GOMES et al., 2000), os quais processam e apresentam os antígenos parasitários aos linfócitos T CD4+ que determinam resposta celular (do tipo Th1), ou humoral (do tipo Th2), culminando com a regressão ou progressão da doença respectivamente. O tipo de resposta imune estimulada vai depender das citocinas que orientam a integração leucocitária no organismo hospedeiro (WILSON, 1988; BOGDAN et al., 1996; CIARAMELLA e CORONA, 2003).

A resistência à infecção por *Leishmania* sp. está ligada à ativação de células T CD4+ do tipo Th1, com produção significativa de IFN- gamma (relacionada à morte intracelular das formas amastigotas nos macrófagos) e IL-2 (PINELLI et al., 1994; BOGDAN et al., 1996; PINELLI et al., 1999). Esse tipo de resposta celular Th1 é induzida pela IL-12 (produzida por macrófagos ativados), pois quando esta citocina ativa a resposta imune celular do tipo Th1,

ela inibe a resposta do tipo Th2, sendo responsável pelo estabelecimento da magnitude da resposta celular Th1 (PINELLI et al., 1994; BOGDAN et al., 1996; PINELLI et al., 1999).

A progressão da doença está usualmente ligada à indução de resposta humoral do tipo Th2 e conseqüente produção de IL-4 (PINELLI et al., 1995; BOGDAN et al., 1996; LUVIZOTTO, 2006), que induz a diferenciação de células B para a produção de anticorpos das classes IgG1 e IgE e de fatores que desativam macrófagos, como IL-10, TGF-beta e prostaglandina E₂ (BOGDAN et al., 1996; BOGDAN e ROLLINGHOFF, 1998; LUVIZOTTO, 2006).

Os órgãos linfóides são alvos na doença, ocorrendo proliferação linfoplasmohistiocitária, resultando em linfadenomegalia generalizada (KEENAN et al., 1984; CORBETT et al., 1992; LUVIZOTTO, 2006; KRAUSPENHAR et al., 2007; BANETH et al., 2009).

Contudo, outros órgãos podem ser acometidos, tais como o fígado, onde as lesões geralmente caracterizam-se por reação inflamatória granulomatosa crônica (TAFURI et al., 2001) ou ainda por infiltrado linfoplasmocitário (RALLIS et al., 2005; KRAUSPENHAR et al., 2007).

Sendo assim, no envolvimento do trato intestinal as lesões podem ser resultantes da reação inflamatória desencadeada pela ação local das formas amastigotas de *Leishmania sp.*. Tais lesões são observadas à microscopia óptica como reação inflamatória linfohistioplasmocitária severa, comprometendo mucosa, submucosa e muscular da mucosa, onde formas amastigotas de *Leishmania sp.* são comumente identificadas no interior de macrófagos (LUVIZOTTO, 2006).

3.OBJETIVOS

3.1Objetivo Geral

* Avaliar as alterações estruturais e marcação imuno-histoquímica do parasitismo no intestino delgado e grosso de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

3.2 Objetivos Específicos

* Avaliar as alterações estruturais e marcação imuno-histoquímica do parasitismo no duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*.

* Avaliação da resposta inflamatória dos segmentos duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto dos intestinos de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 36 cães, de raças e idades variadas procedentes do Centro de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde de Petrolina com sorologia positiva IgG anti-*Leishmania infantum* no teste de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e exame parasitológico, positivo para *Leishmania* sp.

4.2 Exame Clínico

Antes da realização deste estudo, os animais foram submetidos a exame clínico através de anamnese para obtenção de dados referentes ao estado geral do animal, sexo, idade, porte, evolução do processo, além do exame físico que constituiu a avaliação do animal, para identificação de alterações orgânicas, observando-se a existência de sinais sugestivos de LVC.

4.3 Necropsia

Todos os 36 animais selecionados foram submetidos a eutanásia e realizada a necropsia segundo a Resolução n° 714/2002, pelo Centro de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde de Petrolina –através da aplicação intravenosa (IV) com seringa¹ de Thionembutal²® na concentração de 33% na dose de 5,0 mL/Kg de peso corporal.

Foram coletados para este estudo fragmentos do duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto. As amostras imediatamente fixadas após a coleta em solução tamponada de formalina a 10% com pH 7.2, foram acondicionadas em frascos de polietileno devidamente identificadas.

¹ Seringa descartáveis – 3,0 (mL), Becton Dickson

² Thionembutal (Tiopental/Ampola 500mg)

4.4 Macroscopia

Todos os segmentos duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto dos intestinos foram avaliados quanto a presença de lesões na mucosa intestinal sugestivas de LVC.

4.5 Microscopia

As amostras dos tecidos foram processadas em equipamento histotécnico³ automático seguindo-se técnica de rotina para desidratação, diafanização e inclusão em parafina (TOLOSA et al., 2003). Após este procedimento os blocos de parafina, contendo os fragmentos, foram cortados em micrótomo⁴ com espessura entre 4-5 μm e montados em lâminas⁵ histológicas. Em cada lâmina foram colocados dois a três cortes de cada amostra. Posteriormente, os cortes histológicos dos intestinos foram corados com hematoxilina-eosina (H.E.) (TOLOSA et al., 2003) no Laboratório de Patologia Animal no Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

4.6 Avaliação Imuno-Histoquímica pela Estreptoavidina-Peroxidase para Detecção de Formas Amastigotas de *Leishmania* sp.

A imunomarcção das formas amastigotas de *Leishmania* sp foi realizada utilizando-se a técnica de imuno-histoquímica pela estreptoavidina-peroxidase em material biológico embebido em parafina, no laboratório do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) do Departamento de Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) através de metodologia padronizada por Tafuri et al., (2004).

³ Equipamento Histotécnico Automático Ancap

⁴ Micrótomo Leitz Wetzear

⁵ Lâminas para microscopia ponta fosca beiradas não lapidadas 25,4x76,2 mm (1" x 3"). LAMEDID Comercial e Serviços Ltda.

Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle negativo de área não endêmica e um positivo do ICB. Como controle negativo, foi usada Solução Salina Tamponada (SST), em substituição aos anticorpos primários. Como controle positivo utilizou-se uma lâmina com corte histológico de pele de orelha de um cão naturalmente infectado com *Leishmania* sp.

4.7 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas por meio dos programas estatísticos computacionais Prism 4.0 e GraphPad InStat, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$. Para a comparação da reação inflamatória e a carga parasitária utilizou-se o teste de Kruskal Wallis. Para análises de correlação entre parasitismo e inflamação o teste aplicado foi o Coeficiente de Correlação de Spearman.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Exame Clínico

Na anamnese realizada todos os 36 animais examinados apresentaram pelo menos um dos cinco sinais clínicos sugestivos de LVC (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência relativa (FR) e absoluta (FA) dos sinais clínicos dos animais com leishmaniose visceral canina (LVC) provenientes do município de Petrolina, PE, 2010.

Sinais Clínicos	Frequência	
	FR	FA
Caquexia	21/36	58,33
Onicogrifose	19/36	52,77
Úlceras	12/36	33,33
Linfadenomegalia	11/36	30,55
Conjuntivite	8/36	22,22

Os dados aqui observados assemelham-se aos encontrados na literatura, quando são relatados sinais inespecíficos, como linfadenomegalia, úlceras, onicogrifose, caquexia (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; CIARAMELLA e CORONA, 2003; FEITOSA et al, 2000; FEITOSA, 2006; SILVA, 2007; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008; BANETH et al., 2009) e conjuntivite (BANETH et al., 2009) que podem ocorrer no estágio ativo da doença na LVC.

Entretanto, nossos dados diferem de outros autores, que relatam que a maioria dos cães infectados não apresentavam nenhum sinal clínico sugestivo de LVC (NOLI, 1999; DANTAS-TORRES et al., 2008; LANGONI, 2008; BANETH et al., 2009; QUEIROZ et al., 2010).

Convém ressaltar que os 36 animais avaliados neste trabalho não apresentaram sinais clínicos de diarreia, assemelhando-se aos achados observados por Adamama-Moraitou et al. (2007) que ao trabalharem com 31 cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* também não observaram sinais clínicos de diarreia.

5.2. Análise Macroscópica

Nos intestinos delgado e grosso de 100% dos animais estudados neste trabalho não foram observadas alterações macroscópicas dignas de nota nos segmentos duodeno, jejuno íleo, ceco, cólon e reto.

Os resultados observados assemelham-se aos achados encontrados por Adamama-Moraitou et al. (2007) que ao trabalharem com biópsias do cólon de cães, naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, e não confirmados pela técnica de imuno-histoquímica, não observaram alterações macroscópicas em 67,7% (21/31) dos animais estudados, e também não encontraram lesões macroscópicas em 8,7% (2/23) dos cães confirmados pela técnica de imuno-histoquímica. Assemelham-se também aos achados observados por Silva et al. (2002) que não observaram nenhuma lesão macroscópica importante no duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon em um cão com LVC.

Entretanto, os resultados obtidos diferem dos achados encontrados por Ferrer et al. (1991) e Luvizotto (2006) que observaram hiperemia difusa e focos de erosão na mucosa do cólon de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*. Os resultados aqui encontrados diferem ainda dos achados observados por Gonzales et al. (1990) que ao trabalharem com o cólon e o reto de 8 cães experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum* observaram espessamento gradual e difuso da parede, hiperemia da mucosa apresentando uma aparência áspera com pequenas erosões multifocais em sua superfície. Os resultados obtidos diferem também dos achados relatados por Adamama-Moraitou et al. (2007) que ao trabalharem com biópsias do cólon de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* e confirmados pela técnica de imuno-histoquímica, observaram lesões macroscópicas tais como, hiperemia, edema e leves a moderadas erosões no cólon de 25,8% (8/31) dos animais estudados.

5.3. Análise Microscópica

5.3.1 Avaliação Histopatológica

Neste estudo, a alteração histopatológica mais freqüentemente encontrada foi a reação inflamatória linfohistioplasmocitária, ocorrendo em 88,88% (32/36) dos fragmentos de duodenos, 86,11% (31/36) dos fragmentos de jejunos, 97,22% (35/36) dos fragmentos de íleos, 91,66% (33/36) dos fragmentos de cecos, 86,11% (31/36) dos fragmentos de cólons e 72,22% (26/36) dos fragmentos de retos (Figura 1.a, 1.c) (Apêndice 1). Esta reação inflamatória comprometia principalmente a mucosa, a submucosa e a muscular da mucosa.

Os resultados encontrados neste estudo assemelham-se aos observados por Luvizotto (2006) que admite que o envolvimento do trato gastrointestinal pode ser resultante da reação inflamatória desencadeada pela ação local do parasito. Tais lesões são observadas à microscopia como reação inflamatória linfohistioplasmocitária severa, comprometendo mucosa, submucosa e muscular da mucosa, onde formas amastigotas da *L. (L.) infantum* são comumente identificadas no interior de macrófagos. Por outro lado, diferem dos achados relatados por Adamama-Moraitou et al. (2007) que ao trabalharem com biópsias do cólon de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* e não confirmados pela técnica de imunohistoquímica não observaram nenhum tipo de reação inflamatória ao exame histopatológico em 67,7% (21/31) dos animais estudados.

Foram observadas neste estudo a presença de linfócitos, plasmócitos e macrófagos ativado encontrados de forma difusa, muitos destes com formas amastigotas *L. (L.) infantum*, comprometendo principalmente a mucosa, a submucosa e a muscular da mucosa, presentes em fragmentos do duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e reto (Figura 1.a, 1.b, 1.c e 1.d), como também relatado por vários autores (ANDERSON et al., 1980; KEENAN et al, 1984; GONZÁLEZ et al ,1990; FERRER et al, 1991; SILVA et al, 2002; CIARAMELLA e CORONA, 2003; LUVIZOTTO, 2006).

Segundo Gonzales et al. (1990) a razão da infiltração de linfócitos e plasmócitos, juntamente com os macrófagos parasitados com as formas amastigotas, se deve a progressiva estimulação antigênica da *L. (L.) infantum* ocorrendo hiperativação da imunidade humoral, e como resultado, há infiltração destas células, como observado neste trabalho. Convém ressaltar que neste estudo não foram observados formação de granulomas nem células polimorfonucleares em todos os segmentos analisados, evidenciando que a doença possui caráter inflamatório crônico.

Foram observados neste estudo hiperplasia dos nódulos de tecido linfóide agregados (placas de Payer) no duodeno, jejuno e principalmente no íleo sendo este o órgão mais acometido e dos nódulos de tecido linfóide isolados em segmentos do ceco, cólon e reto. Esses achados assemelham-se aos achados relatados por Keenan et al. (1984) que admitem que esta hiperplasia, associada ou não ao parasitismo, pode ocorrer no intestino delgado, jejuno e íleo e no intestino grosso, ceco e cólon, porém é mais pronunciada no íleo e ceco.

É possível que a o maior acometimento do segmento íleo observado neste trabalho se deva ao maior número de placas de Payer presentes neste órgão (ANDERSON, 2001; JUNQUEIRA et al., 2004).

Alterações circulatórias, tais como, hiperemia, hemorragia e congestão foram observadas em 66,66% (24/36) dos fragmentos de duodenos, 69,44% (25/36) dos fragmentos de jejunos, 69,44% (25/36) dos fragmentos de íleos, 77,77% (28/36) dos fragmentos de cecos, 80,55% (29/36) dos fragmentos de cólons e 77,77% (28/36) dos fragmentos de retos (Apêndice 2). Nossos resultados assemelham-se aos achados observados por Carvalho (2010) que trabalhando com 8 cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* e 8 cães experimentalmente infectados, também encontrou congestão no íleo destes cães, sendo mais pronunciada nos animais experimentalmente infectados.

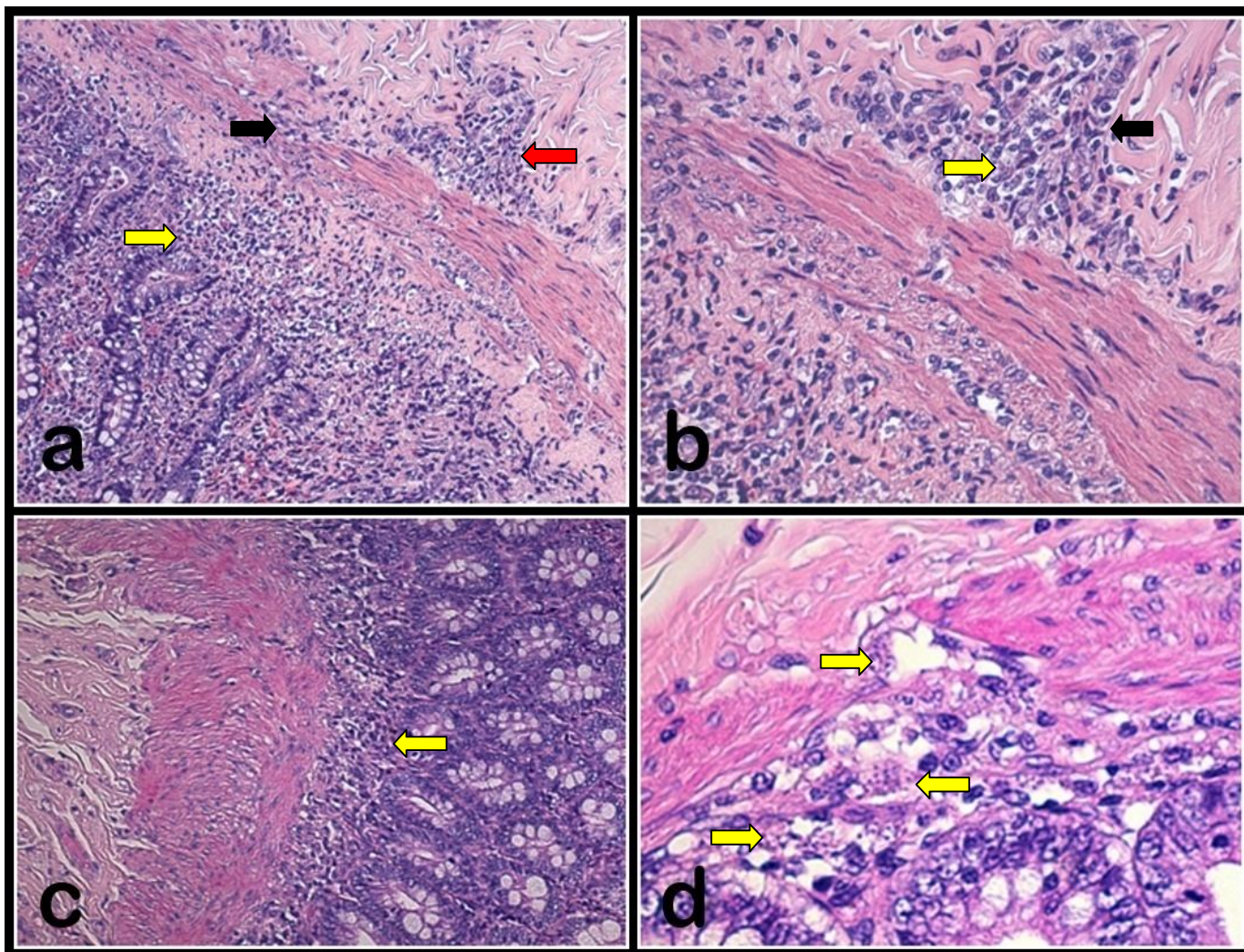


Figura 1

Figura 1.a- Jejunum de cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Inflamação linfohistioplasmocitária na mucosa (seta amarela), na muscular da mucosa (seta preta) e submucosa (seta vermelha). HE. 220X

Figura 1.b- Jejunum de cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Macrófagos (seta amarela) e plasmócitos (seta preta) HE. 440X

Figura 1.c- Ceco de cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Inflamação linfohistioplasmocitária na mucosa (seta amarela) HE. 220X.

Figura 1.d- Ceco de cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Macrófagos ativados parasitados com formas amastigotas de *L. (L.) infantum* (seta amarela). HE. 440X.

5.3.2 Avaliação Imuno-Histoquímica

A presença de formas amastigotas de *L. (L.) infantum* no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ceco, cólon e reto) dos cães analisados foi confirmada em 22,22% (8/36). Vale ressaltar que as marcações foram observadas em todos os segmentos analisados e comprometiam principalmente a mucosa, a submucosa e a muscular da mucosa (Figura 2.a, 2.b, 2.c e 4.d). Observamos que o ceco foi o segmento mais acometido com seis imunomarcações, o íleo com quatro, o jejuno e reto com três e o duodeno e cólon com duas. As análises que vem a seguir foram realizadas apenas nos oito animais positivos imuno-histoquimicamente.

Os resultados aqui observados assemelham-se aos achados observados por Silva et al. (2002) que relatam o caso clínico de um cão naturalmente infectado por *L. (L.) infantum*, onde foi confirmada a presença de formas amastigotas pela técnica de imuno-histoquímica pela estreptoavidina-peroxidase no duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon, onde o maior comprometimento observado foi da mucosa e submucosa, respectivamente. Esses resultados também são semelhantes aos achados observados por Ferrer et al. (1991) que relataram o caso clínico de dois cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, cuja a presença de formas amastigotas foi confirmada pela técnica de imuno-histoquímica pela peroxidase no segmento cólon de cada cão. Assemelham-se também aos achados encontrados por Adamama-Moraitou et al. (2007) que ao trabalharem com biópsias do cólon de cães, naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, também observaram a presença de formas amastigotas na mucosa do cólon de 32,3% (10/31) dos cães pela técnica de imuno-histoquímica.

Por outro lado, diferem dos achados de Adamama-Moraitou et al. (2007) que trabalhando apenas com biópsias de cólon de 10 cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* não encontraram inflamação linfoplasmocitária. Estes autores revelaram, no entanto a presença lesão piogranulomatosa em 90% (9/10) ou granulomatosas em 10% (1/10) dos animais que foram detectados imuno-histoquimicamente parasitas na mucosa do cólon.

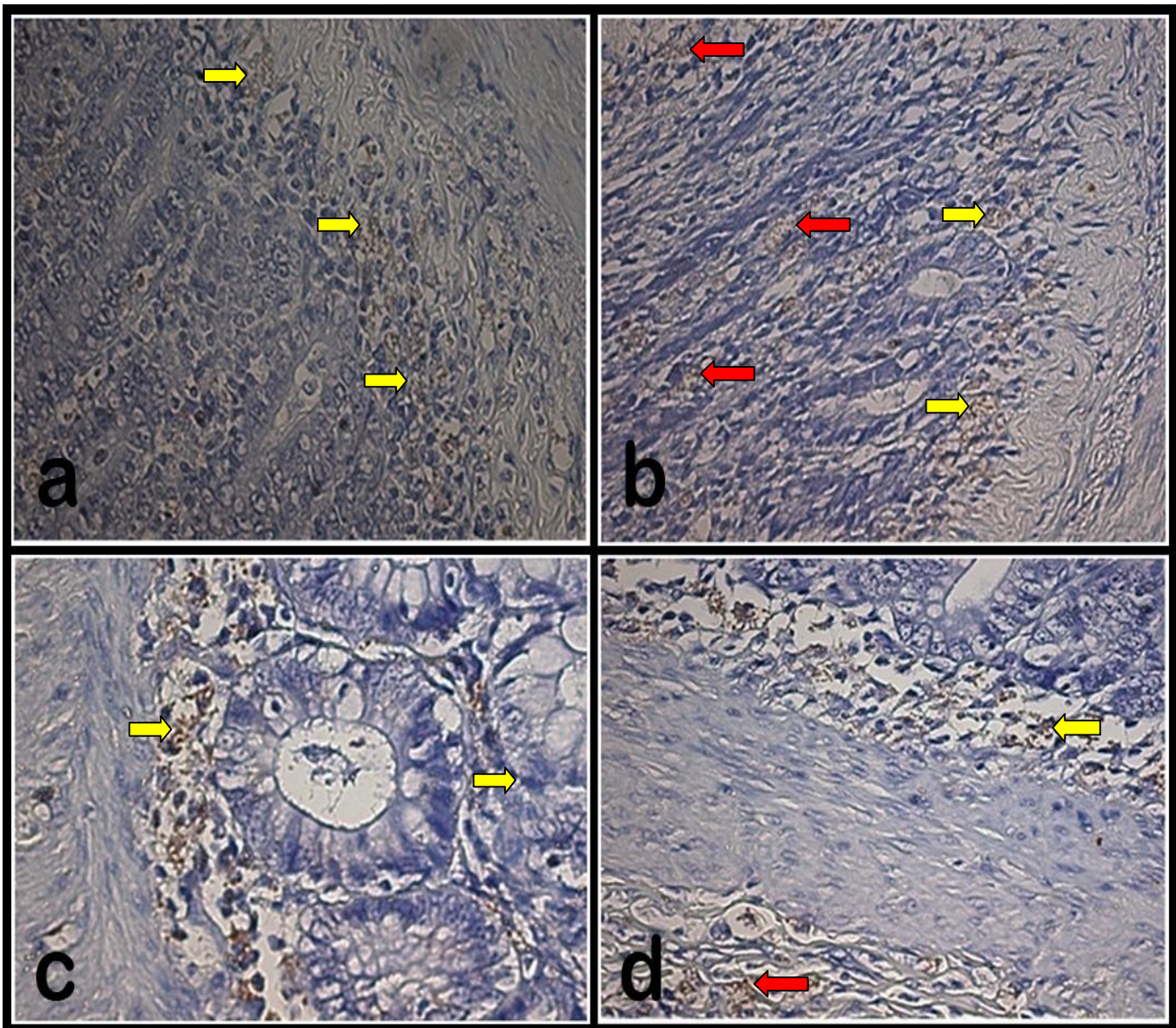


Figura 2

Figura 2.a- Jejunum de cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Imunomarcção positiva de formas amastigotas de *L. (L.) infantum* (seta amarela) pelo método imuno-histoquímico em Estreptoavidina-Peroxidase IHQ 440X.

Figura 2.b- Jejunum de um cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Imunomarcção positiva de formas amastigotas de *L. (L.) infantum* na mucosa (seta amarela) e entre as vilosidades (seta vermelha) pelo método imuno-histoquímico em Estreptoavidina-Peroxidase. IHQ 440X.

Figura 2.c- Ceco de um cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Imunomarcção positiva de formas amastigotas de *L. (L.) infantum* (seta amarela) pelo método imuno-histoquímico em Estreptoavidina-Peroxidase. IHQ 440X.

Figura 2.d- Ceco de um cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Imunomarcção positiva de formas amastigotas de *L. (L.) infantum* na mucosa (seta amarela) e na submucosa (seta vermelha) pelo método imuno-histoquímico em Estreptoavidina-Peroxidase. IHQ 440X.

Na Figura 3. observa-se a comparação da carga parasitária entre duodeno e os outros segmentos do trato intestinal. Quando avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis com Post Test Dunns constata-se diferença estatística significativa entre eles ($p=0,0001$). Provavelmente isto decorreu da pequena carga parasitária do reto, pois os demais segmentos demonstram ser estatisticamente semelhantes, ou seja, possuem carga parasitária semelhantes.

Apesar da diferença estatística da carga parasitária ($p= 0,0001$) entre todos os segmentos do trato intestinal demonstrar que o segmento reto possuía carga parasitária menor (Figura 3), quando analisamos a comparação da inflamação entre todos os segmentos do TI (Figura 4) não se observa diferença estatística, ou seja, a resposta inflamatória teve a mesma intensidade em todos os segmentos e provavelmente sua intensidade de resposta não está relacionada com a carga parasitária presente. Isso demonstra que o reto apresentou-se inflamado como os outros segmentos do TI (Figura 4), independente da carga parasitária presente ser menor que a dos demais segmentos.

Os resultados aqui vistos assemelham-se aos achados encontrados por Gonzales et al. (1990) que trabalhando com cólon e reto de cães experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum* observaram que a carga parasitária variou nos macrófagos nestes segmentos no curso da doença, e para este autor, o decréscimo da carga parasitária não está diretamente relacionado com a intensidade da resposta inflamatória.

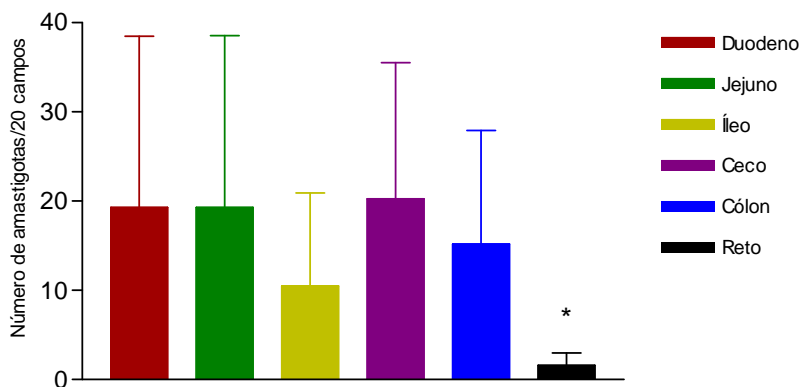


Figura 3: Comparação da carga parasitária entre todos os segmentos do trato intestinal avaliados de oito cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* e positivos a imuno-histoquímica. $p = 0,0001$ (* Diferença estatística)

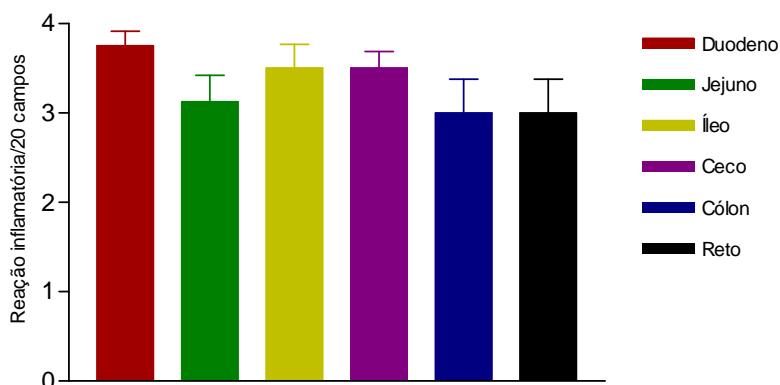


Figura 4: Comparação da reação inflamatória entre os segmentos do trato intestinal de oito cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* positivos pela IHQ, ($p = 0,4040$).

A comparação entre carga parasitária e reação inflamatória em todos os segmentos do TI demonstrou diferença estatística ($p < 0,0070$) (Figura 5), evidenciando que a intensidade da inflamação independe da carga parasitária presente. A correlação entre parasitismo e inflamação revelou-se positiva, mas fraca, onde $r^2 = 0,5895$ (Figura 6), demonstrando que o parasitismo e a inflamação aumentam concomitantemente. Nossos resultados assemelham-se aos achados observados por Luvizotto (2006), que sugeriu que a reação inflamatória envolvendo o trato intestinal pode ser desencadeada pela ação local do parasito.

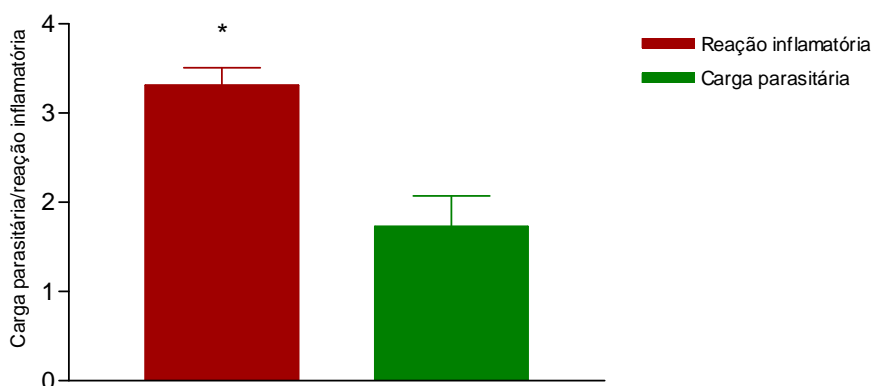


Figura 5. Comparação entre carga parasitária e reação inflamatória em todos os segmentos do trato intestinal de oito cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, positivos pela IHQ, $*p < 0,0070$.

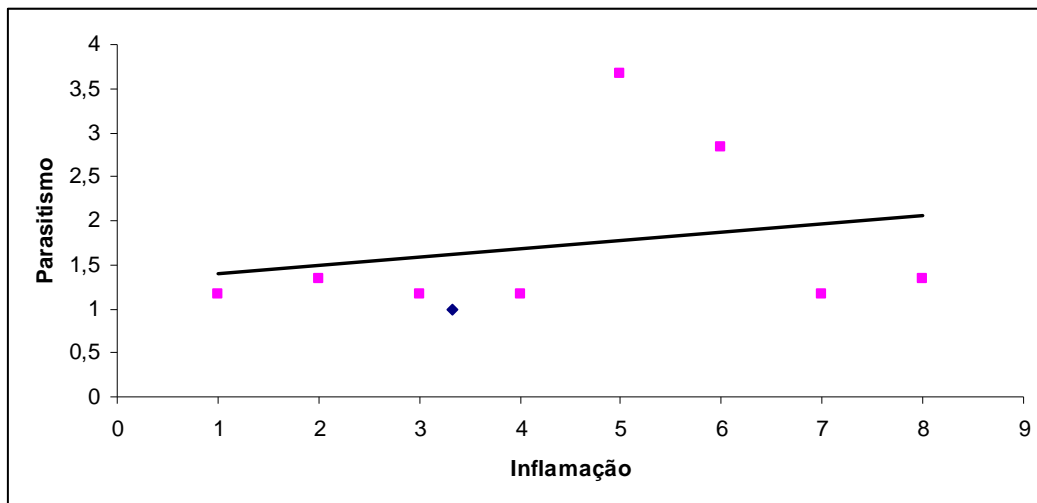


Figura 6: Correlação entre parasitismo e inflamação em oito cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* positivos pela IHQ, ($r^2 = 0,5895$).

6. CONCLUSÕES

A ocorrência da reação inflamatória linfohistioplasmocitária nos intestinos delgado e grosso de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* é a mais expressiva lesão observada e está correlacionada com a ocorrência do parasita nestes órgãos.

A marcação imuno-histoquímica pela streptoavidina-peroxidase confirmou a presença de formas amastigotas *L. (L.) infantum* em todos os segmentos dos intestinos delgado e grosso.

7. REFERÊNCIAS

ACHESON, D. W. K.; LUCCIOLI, S. Mucosal immune responses. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 387–404, 2004.

ADAMAMA-MORAITOU, K. K. et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, v. 76, n. 1, p. 53-57, 2007.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, [s. l.], v. 57, p. 1-87, 2004.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ALVES, W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, v.1, 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: **Organización Panamericana de Salud**, 2006, p. 94-98.

ANDERSON, D. C. et al. Endemic Canine Leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v. 7, p. 94-96, 1980.

ANDERSON, N. C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. **Nature Reviews Immunology**, New York, v. 1, p. 59-67, 2001.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Austrália, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

AZEVEDO, J. P. et al. Achados histopatológicos da pele de cães acometidos por leishmaniose visceral canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 2003, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: 2003.

BANETH, G. et al. Canine Leishmaniosis – New concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 24, n.7, p. 324-330, 2009.

BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.

BOGDAN, C. et al. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 8, p. 517-525, 1996.

BOGDAN, C.; ROLLOINGHOFF, M. The immune response to leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, Austrália, v. 28, p. 121-134, 1998.

BRANDTZAEG, P. E. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. **Annals of the New York Academy of Science**, [s. l.], v. 964, p. 13-45, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 120p.

BRITO, F. L. C. et al. Alterações oculares em cães infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, p. 768-775, 2006.

CARVALHO, R. M. A. **Aspectos histopatológico da mucosa intestinal de cães naturalmente e experimentalmente infectados com leishmania chagasi**. 2010. 46f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, Bahia.

CASTRO, A. G. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996. 86 p.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Naples, v. 25, n. 5, p. 358-368, 2003.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, London, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CORBETT, C. E. P. et al. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. **International Journal of Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 417-433, 1992.

COSTA, C. H. N. et al. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis? **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 93, p. 464, 1999.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from um urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 155, p. 24-31, 2008.

DAVIDSON, R. N. Leishmaniasis in humans, with particular reference to leishmaniasis with a canine reservoir. In: CANINE LEISHMANIASIS, 1999, Barcelona, **Proceedings...** Barcelona: Killick-Kendrik, 1999. p. 46-53.

DENEROLLE, P. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). **Pratique Médecine Chirurgie Animal Compagnie**, La Seyne-Sur-Mer, v. 31, n. 2, p. 137-145, 1996.

DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P. Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. In: CANINE LEISHMANIASIS, 1999, Barcelona, **Proceedings...** Barcelona: Killick-Kendrik, 1999. p.18-25.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v. 2, p. 692 -693, 2004.

DESJEUX, P. Urbanisation of the leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2002, Sevilla, **Proceedings...** Sumène: Killick-Kendrick, 2002. p. 49-55.

FEITOSA, M.M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 9 – 14.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. **Revista Intervet Pet**, [s. l.], p. 1- 15, 2001.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FERRARI, H. F.; RIBEIRO, D.; LUVIZOTTO, M. C .R. Miocardite associada à *Leishmania* sp em cão-relato de caso. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 48.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS, 1999, Barcelona, **Proceedings...** Barcelona: Killick-Kendrick, 1999. p. 6-10.

FERRER, L. M. et al. Chronic colitis due to leishmaniasis infection in two dogs. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v. 28, p. 342-343, 1991.

GARCIA-ALONSO, M.; BLANCO, A.; REINA, D. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 18, p. 617-623, 1996.

GONZALES, J. L. et al. Erosive colitis in experimental canine leishmaniasis. **Journal Veterinary of Medicine**, Berlin, v. 37, n. 5, p. 377-382, 1990.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 47, p. 42-47, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. O Trato Digestivo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. Capítulo 15, p. 299-316.

KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the german shepherd dog. II. Pathology. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v. 21, p. 80-86, 1984.

KRAEHENBUHL, J. P.; NEUTRA, M. R. Epithelial M cells: differentiation and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 16, p. 301–332, 2000.

- KRAUSPENHAR, C. et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomia longipalpis* and the eco-epidemiology of american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.
- LANGONI, H. et al. American visceral leishmaniasis: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 11, n. 3, 2005.
- LANGONI, H. Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral Canina e Situação no Estado de São Paulo. **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu**, Departamento de Higiene e Saúde Pública, Botucatu, São Paulo, Brasil. p.1-15, 2008.
- LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 15 – 22.
- MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.
- MELO, F. et al. Difuse intralobular liver in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, v. 79, n. 2, p. 198-204, 2008.
- MILES, M. A. et al. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies. From canine leishmaniosis; an update. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Killick-Kendrick, 1999. p. 46-53.
- NICOLLE, C. J. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de leishman observés en Tunisie. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, local, v. 3, p. 1-26, 1908.
- NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, Milán, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.
- PINELLI, E. Et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 25, p. 1594-1600, 1995.
- PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

- PINELLI, E. et al. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 1, p. 237-243, 1999.
- POCAI, E. A. et al. Leishmaniose visceral (calazar), cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.
- QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.
- RALLIS, T. et al. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 132, n. , p. 145–152, 2005.
- REICHMANN, M. L. A. B. Leishmaniose visceral canina – uma zoonose emergente. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: 2006. p. 7-8.
- SANTA-ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, I. C. S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.
- SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of leishmania infantum romastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 2, p. 193-198, 2000.
- SCHENK, M.; MUELLER, C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 391–409, 2008.
- SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.
- SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 20-26, 2007.
- SILVA, F. L. et al. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a case report 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 340-344, 2002.
- SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. **The Veterinary Quartely**, Netherlands, v. 10, n. 1, p. 1-16, 1988.
- SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Canine leishmaniosis a challenging zoonosis. **European Journal of Comparative Animal Pathology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 232-241, 2008.
- TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 96, p. 203–212, 2001.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunologic Methods**, [s. l.], v. 292, p. 17– 23, 2004.

TAFURI, W. L. et al. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 139 -145, 1989.

TOLOSA, E. M. C. et al. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2^a Ed. São Paulo: manole, 2003. p. 20-45.

UEMATSU, S. et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing toll-like receptor 5. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 769-776, 2008.

VINUELAS, J. et al. Menigial leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 101, p. 23-27, 2001.

WILSON, M. E. et al. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, [s. l.], v. 161, p. 6148 - 6155, 1998.

8. APÊNDICE

8.1 APÊNDICE 1

Tabela 2 – Alterações inflamatórias encontradas em cada segmento do intestino delgado e grosso de cães naturalmente infectados por LVC.

Animal	Duodeno		Jejuno		Íleo		Ceco		Cólon		Reto	
	ILHP	M.A	ILHP	M.A	ILHP	M.A	ILHP	M.A	ILHP	M.A	ILHP	M.A
1	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
2	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
3	3	2	2	2	3	2	2	3	2	2	2	3
4	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
5	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
6	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0
7	1	0	1	0	1	0	2	0	2	0	1	0
8	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
9	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
10	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
11	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
12	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
13	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
14	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
15	0	0	0	0	2	0	2	1	1	0	0	0
16	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0
17	2	0	3	0	3	1	1	0	3	1	3	1
18	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
19	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
20	3	0	2	0	3	1	2	2	2	0	1	0
21	2	0	0	0	2	0	3	0	1	1	1	1
22	3	1	2	1	2	3	2	2	2	2	0	0
23	2	0	1	0	3	0	3	0	0	0	0	0
24	2	0	1	0	3	1	3	1	2	2	3	3
25	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3
26	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3
27	3	0	2	0	3	0	3	3	3	2	3	2
28	3	0	1	0	1	0	2	2	3	1	2	2
29	2	0	3	0	2	0	0	0	1	0	0	0
30	2	0	1	0	3	0	2	1	3	2	2	1
31	2	0	2	1	2	0	1	0	1	1	0	0
32	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
33	3	0	1	0	2	0	1	0	2	0	1	0
34	2	0	1	0	2	0	1	0	1	0	0	0
35	3	1	3	0	3	0	3	1	1	0	1	0
36	2	1	3	3	3	1	2	1	3	3	2	1

ILHP = Inflamação linfocitoplasmocitária; **M.A** = Macrófago ativado

0 = Ausente; 1 = Discreto; 2 = Moderado; 3 = Intenso

8.2 APÊNDICE 2

Tabela 3 – Alterações circulatórias encontradas em cada segmento do intestino delgado e grosso de cães naturalmente infectados por LVC.

Animal	Duodeno			Jejuno			Íleo			Ceco			Cólon			Reto		
	Hip	Hem	Con	Hip	Hem	Con	Hip	Hem	Con	Hip	Hem	Con	Hip	Hem	Con	Hip	Hem	Con
1	2	1	2	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
2	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
3	3	0	3	3	0	3	2	0	2	1	0	1	1	0	1	2	0	2
4	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1
6	1	0	1	0	0	0	2	1	2	1	0	1	0	0	0	1	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	0	1	1	1	1
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	2	1
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
13	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
14	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
15	0	0	0	1	0	1	2	0	2	1	0	1	1	0	1	0	0	0
16	2	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
17	1	0	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0
18	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
19	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
20	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
22	0	0	0	2	0	2	2	0	2	2	0	2	3	0	3	1	0	1
23	2	0	2	1	1	1	3	0	3	0	0	0	1	0	1	1	0	1
24	2	1	2	3	0	3	3	0	3	2	0	2	3	0	3	3	0	3
25	3	0	3	3	0	3	2	0	2	3	0	3	3	0	3	3	1	3
26	1	1	1	0	2	0	3	0	3	1	0	1	3	0	3	0	0	0
27	3	0	3	3	0	3	2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2
28	3	0	3	1	0	1	1	0	1	1	0	1	3	1	3	1	0	1
29	3	1	3	3	1	3	3	0	3	1	0	1	1	0	1	1	0	1
30	1	0	1	0	0	0	3	0	3	3	0	3	3	1	3	1	0	1
31	3	0	3	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
32	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
33	3	0	3	2	0	2	3	0	3	1	0	1	1	0	1	1	0	1
34	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
35	3	0	3	3	0	3	3	0	3	2	1	2	2	0	2	1	0	1
36	1	0	1	3	0	3	2	0	2	1	0	1	3	0	3	2	0	2

Hip = Hiperemia; **Hem** = Hemorragia; **Con** = Congestão passiva

0 = Ausente; 1 = Discreto; 2 = Moderado; 3 = Intenso

9. ANEXOS

9.1 ANEXO 1

PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PELA REAÇÃO STREPTOAVIDINA-PEROXIDASE

1- Desparafinar (se for o caso) – 15 min. (Xilol I e II) Bateria Rosa (Aqui se coloca a lâmina Pink Controle)

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

OBS: Lâminas Criostato começar nos álcoois

2- Dar 01 banho de PBS (1X) – 5 min.

Para 1 litro de PBS 1X
100mL de PBS concentrado e 900 ml de água destilada

3 – Bloqueio da Peroxidase Endógena :

Colocar os cortes em solução de água oxigenada (H₂O₂) 30 volumes por 20 a 30 min.

H₂O₂ 30v ----- 3,5 ml ----- **7,0 ml** ----- 10 ml

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

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

5- Bloqueio dos Sítios de Ligações Antigênicos Inespecíficos :

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

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

ou

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

6 - Dar 01 banho de PBS 1X

7- Enxugar o excesso e pingar o soro primário: SORO DE CÃO NATURALMENTE INFECTADO (SNI-CÃO) 1: 100 .

Incubar em câmara úmida a 4°C (geladeira) por 16 a 18 horas (“overnight”).

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

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

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

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

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

13- Revelação :

PBS _____ **200 ml** _____ 250 ml

DAB _____ **50 mg** (= 0,050 g) _____ 60 mg

H₂O₂.40v _____ **400 µl** _____ 500 µl

OBS: Homogeneizar bem o DAB antes de filtrar e Filtrar a Hematoxilina

Incubar os cortes por 5 min. (controle ao microscópio óptico)

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

15- Lavar em água corrente por 10 minutos

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

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

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

Montar a lâmina.

9.2 ANEXO 2

DILUIÇÕES UTILIZADAS PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA

1. Solução Salina Tamponada (SST) ou (PBS) (pH 7,2 – 7,4)

Para 1 litro de solução concentrada 10X

Na₂HPO₄11,56g

KH₂PO₄ 02,72g

Nacl 87,00g

Completar com 1 litro de água destilada

OBS.: O PBS para Imuno-histoquímica deve ser diluído. Para 1 litro, coloca-se 100ml de PBS concentrado e completa com 900ml de água destilada (1X).

Observa-se também o pH que deve estar entre 7,2 e 7,4.

2. Soro Albumina Bovina (BSA)

0,025 _____ 25ml de PBS para 25ml

0,05g _____ 50ml de PBS para 50ml

0,1 _____ 100ml de PBS para 100ml

OBS.: O PBS deve ser diluído

3. Leite em Pó desnatado 6%

12g _____ 200ml de PBS diluído (1X)

4. Soro de Cão

1:100 200 µl de soro de cão (CA51) _____ 19.800µl de BSA = 20ml

1:50 400 µl de soro de cão (CA51) _____ 19.600µl de BSA = 20ml

1:10 10µl de soro de cão (CA51) _____ 90µl de BSA = 100µl

