

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**

**DEFINIÇÃO DE UM MODELO DE MENSURAÇÃO PARA AVALIAR  
A DISTRIBUIÇÃO DE POPULAÇÕES LEUCOCITÁRIAS NO BAÇO NA  
LEISHMANIOSE VISCERAL**

**ALAN CRONEMBERGER ANDRADE**

**SALVADOR  
2009**

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**

**DEFINIÇÃO DE UM MODELO DE MENSURAÇÃO PARA AVALIAR  
A DISTRIBUIÇÃO DE POPULAÇÕES LEUCOCITÁRIAS NO BAÇO NA  
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em  
Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde  
Pública, como requisito parcial para aprovação do 4º  
ano deste Curso de Graduação.

Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos

Orientador

Joselli Santos Silva

Co-orientadora

**SALVADOR  
2009**

Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca da EBMSP

A553 Andrade, Alan Cronemberger.  
Definição de um modelo de mensuração para avaliar a distribuição de  
populações leucocitárias no baço na leishmaniose visceral. / Alan  
Cronemberger Andrade. – Salvador, Bahia, Brasil: Escola Bahiana de Medicina  
e Medicina e Saúde Pública. 2009.

44 f.

Monografia (Graduação) – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.  
Requisito parcial para a aprovação no 4º ano médico, 2009.

Orientação: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos; Sr. Joseli  
Santos Silva.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Baço. 3. Imunohistoquímica.  
4. Morfometria. I. Título.

CDU: 616.9

**ALAN CRONEMBERGER ANDRADE**

**DEFINIÇÃO DE UM MODELO DE MENSURAÇÃO PARA AVALIAR  
A DISTRIBUIÇÃO DE POPULAÇÕES LEUCOCITÁRIAS NO BAÇO NA  
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em  
Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde  
Pública, como requisito parcial para aprovação do 4º  
ano deste Curso de Graduação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

---

---

Washington Luis Conrado dos Santos  
Professor Adjunto da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública  
Pesquisador Titular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ  
Orientador

*If, as we may reasonably infer, the physiological processes of mammals are similar, it is not improbable that the human body deprived of its spleen shows a similar increased susceptibility to infection.*

Morris & Bullock, 1919

*Aos meus avós, pelo inestimável legado.*

*Para meus pais. Para meu irmão.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares e aos meus amigos, que de todas as formas sempre me deram carinho e me incentivaram.

Ao meu orientador, Dr. Washington, pelos conselhos e zelo na correção e execução do trabalho. À co-orientadora, Joselli, que não só me ensinou muito do que aqui apresento, como dividiu a sua companhia e as preocupações durante o trabalho. A eles se estende o conceito mais amplo de orientação científica.

A Dra. Cláudia Carvalho Santana, que, assistida pelo Dr. José Vasallo, contribuiu para a confecção do material de imunistoquímica, base deste trabalho.

A Leina dos Santos, estudante de iniciação científica, que contribuiu para a morfometria.

A Micely Del'Rei Hermida, pela companhia no laboratório e ensinamentos valiosos sobre diagramação e apresentação gráfica.

A Paula, Glória, Priscila e Ângela, pela amizade e companheirismo que contribuíram para que os dias fossem mais agradáveis ainda na FIOCRUZ.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção (LPBI).

A todos os laboratórios e funcionários do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

À FIOCRUZ e ao CPqGM, pela infra-estrutura pessoal e física que possibilitaram a execução do trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de Iniciação Científica.

À Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, que nos fornece todo suporte pedagógico necessário. Em especial, à Dra. Liliane Lins, que diretamente fez parte da minha formação científica.

# SUMÁRIO

## LISTA DE ABREVIATURA

## RESUMO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
2.1 A LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA .....	11
2.2 A LEISHMANIOSE VISCERAL COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA .....	15
2.3 A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA .....	16
2.4 FUNÇÃO E ESTRUTURA ESPLÊNICA .....	18
2.5 O BAÇO NA LEISHMANIOSE VISCERAL .....	21
2.6 ALTERAÇÕES ESPLÊNICAS EM OUTRAS DOENÇAS .....	24
<b>3. OBJETIVO</b> .....	26
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
5.1 ANIMAL E ESPÉCIMES .....	28
5.2 MODELO DE ANÁLISE MORFOMÉTRICA .....	31
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>6. RESULTADOS</b> .....	35
6.1 DENSIDADE CELULAR .....	35
6.2 PROPORÇÃO DAS ÁREAS DE POLPA VERMELHA E POLPA BRANCA .....	36
6.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS COMPARTIMENTOS DA POLPA BRANCA .....	36
6.4 NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS NOS COMPARTIMENTOS DA POLPA BRANCA .....	38
6.5 NÚMERO RELATIVO DE CÉLULAS NA POLPA VERMELHA E NA POLPA BRANCA .....	39
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b> .....	45



## LISTA DE ABREVIATURA

<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno (do inglês <i>antigen presenting cell</i> )
<b>BFOL</b>	Linfócito B folicular
<b>BZM</b>	Linfócito B de zona marginal
<b>CD</b>	Nomenclatura sistematizada de moléculas (do inglês <i>cluster of differentiation</i> )
<b>CCR</b>	Receptor de quimiocinas contendo dois resíduos de cisteína juntos
<b>CCL</b>	Ligantes de quimiocinas contendo dois resíduos de cisteína juntos
<b>CXC</b>	Ligantes de quimiocinas com mais de dois resíduos de cisteína juntos
<b>DC</b>	Células dendríticas (do inglês <i>dendritic cell</i> )
<b>FDC</b>	Célula dendrítica folicular (do inglês <i>follicular dendritic cell</i> )
<b>FOL</b>	Folículo da polpa branca esplênica
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LV</b>	Leishmaniose visceral
<b>LT</b>	Linfotoxina
<b>LVC</b>	Leishmaniose visceral canina
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês <i>main hiscompatibility complex</i> )
<b>MØMM</b>	Macrófago metalofílico da zona marginal esplênica
<b>MØPV</b>	Macrófagos da polpa vermelha
<b>MØZM</b>	Macrófago de zona marginal
<b>PALS</b>	Bainha periarteriolar de linfócitos do baço
<b>PB</b>	Polpa branca do baço
<b>PV</b>	Polpa vermelha do baço
<b>T<sub>H</sub></b>	Linfócitos T auxiliares (do inglês <i>T helper</i> )
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>ZM</b>	Zona marginal do baço

## RESUMO

DEFINIÇÃO DE UM MODELO DE MENSURAÇÃO PARA AVALIAR A DISTRIBUIÇÃO DE POPULAÇÕES LEUCOCITÁRIAS NO BAÇO NA LEISHMANIOSE VISCERAL. **ALAN CRONEMBERGER ANDRADE**. O cão é o principal reservatório de parasitos *Leishmania chagasi/Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) em nosso meio. A LV está associada com atrofia e desorganização do tecido linfóide esplênico, algo que compromete o desenvolvimento de respostas imunes. O objetivo deste estudo é desenvolver um modelo de morfometria capaz de identificar mudanças na distribuição das populações celulares em tecido linfóide esplênico de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. Para isto, foi utilizado material esplênico de cães com tecido linfóide organizado ou desorganizado submetido a imunohistoquímica para a identificação de células positivas para Ki-67 (células em proliferação), CD3 (linfócitos T) e CD79 $\alpha$  (linfócitos B). O método de morfometria, desenvolvido, foi adequado para identificar diferenças quantitativas na distribuição das populações celulares desse tecido. A densidade de células Ki67<sup>+</sup> foi maior nos folículos e na polpa vermelha dos animais com tecido esplênico organizado do que em animais com tecido linfóide esplênico desorganizado (teste Mann-Whitney,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). A densidade de linfócitos T CD3<sup>+</sup> foi semelhante em diferentes regiões da polpa branca ou vermelha dos animais, com ou sem tecido linfóide esplênico organizado. A densidade de CD79 $\alpha$ <sup>+</sup> (células B) foi maior nos folículos nos animais com tecido esplênico organizado do que em animais com tecido linfóide esplênico desorganizado (teste Mann-Whitney,  $p < 0,02$ ). Observou-se também a redução do número total de células em proliferação e de células B no folículo de animais com a desorganização do tecido do baço. Os dados sugerem que a desorganização do tecido esplênico, observada em cães com LV é associada com a diminuição da proliferação celular e da população de células B em folículos.

**PALAVRAS-CHAVE:** leishmaniose visceral canina, baço, imunohistoquímica, morfometria.

## ABSTRACT

DEFINING A MEASUREMENT MODEL TO ASSESS THE DISTRIBUTION OF SPLENIC LEUKOCYTE POPULATIONS IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS. **ALAN CRONEMBERGER ANDRADE**. The dog is the main reservoir of *Leishmania chagasi* and *Leishmania infantum* parasites, the etiological agents of visceral leishmaniasis (VL) in northeastern Brazil. VL is associated with atrophy and disorganization of the splenic lymphoid tissue, compromising the development of immune responses. The aim of this study was to develop a morphometric model capable of identifying changes in the distribution of cell populations in splenic lymphoid tissue of dogs naturally infected with *L. chagasi*. For this, splenic histological material from dogs with organized or disorganized lymphoid tissue submitted to immunohistochemistry was used to identify cells positive for Ki-67 (proliferating cells), CD3 (T-lymphocytes) and CD79 $\alpha$  (B-lymphocytes). The method of morphometry developed was adequate to identify quantitative differences in the distribution of cell populations of this tissue. The density of Ki67 + cells was higher in the follicles and in the red pulp of animals with organized splenic tissue than in animals with disorganized splenic lymphoid tissue (Mann-Whitney test,  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively). The density of CD3 + T-lymphocytes was similar in the different regions of the white or red pulp of the animals, with or without organized splenic lymphoid tissue. The density of CD79 $\alpha$  + (B cells) was higher in the follicles in animals with organized splenic tissue than in animals with disorganized splenic lymphoid tissue (Mann-Whitney test,  $p < 0.02$ ). It was also observed a reduction in the total number of proliferating cells and B cells in the follicle of animals with the disorganization of the spleen tissue. The data suggest that the disorganization of splenic tissue, observed in dogs with VL, is associated with decreased cell proliferation and the population of B cells in follicles.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, spleen, immunohistochemistry, morphometry.

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) existente em nosso meio é zoonótica, causada pela *L. chagasi*, transmitida por fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e tem o cão como principal reservatório urbano. A doença cursa com febre, adinamia, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e imunodepressão (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Tem alta letalidade se não tratada (JHA *et al.*, 1999).

Nas infecções por *Leishmania* o baço sofre alterações arquiteturais potencialmente capazes de comprometer sua função como órgão linfoide secundário. De fato, a ausência do baço, aumenta a mortalidade por bactérias encapsuladas (KYAW *et al.*, 2006) e indivíduos em estágios avançados de LV, têm maior prevalência de infecções bacterianas (ANDRADE *et al.*, 1990).

Estudando as alterações esplênicas em cães naturalmente infectados, nosso grupo observou que animais definidos como potencialmente susceptíveis (com teste cutâneo negativo e cultura esplênica para *Leishmania* positiva), tiveram maior frequência de desorganização estrutural (14/25,  $P < 0,001$ ), atrofia dos folículos linfóides (20/25,  $P = 0,004$ ) e atrofia de zona marginal (15/25,  $P = 0,002$ ) (SANTANA *et al.*, 2008).

Para investigar a associação dessas alterações arquiteturais com distúrbios na distribuição de populações leucocitárias no baço desenvolvemos uma sistemática de morfometria levando em consideração as características estruturais do tecido esplênico e testamos essa sistemática para estimar as diferenças na distribuição das populações celulares potencialmente envolvidas no processo de desorganização do tecido esplênico. Examinamos a distribuição de células em proliferação (proteína Ki-67) linfócitos T (CD3) e linfócitos B (CD79 $\alpha$ ) em baços de cães de uma área endêmica para LV, com e sem desestruturação do tecido esplênico. Os dados apresentados neste trabalho mostram diferenças na distribuição de populações celulares nesses dois

grupos de animais. Esses dados serão correlacionados com marcadores de susceptibilidade ou resistência à leishmaniose visceral canina em futuros trabalhos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA

O termo leishmaniose está relacionado à doença humana causada pela infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. Os parasitos de diferentes espécies, depois de inoculados, têm tropismo diferenciado, podendo mais tarde ser encontrados na pele, em mucosas e em órgãos do sistema reticuloendotelial. Este acometimento viscerotrópico, chamado leishmaniose visceral (LV), é uma das síndromes clínicas relacionadas à infecção por *Leishmania* spp. A maioria dos casos de LV está etiologicamente relacionada à infecção por espécies do complexo *Leishmania donovani*: *L. donovani* ROSS, 1903; *L. infantum* NICOLLE, 1908; *L. chagasi* CUNHA & CHAGAS, 1937. Estas duas últimas espécies, antes tidas como espécies distintas, hoje são consideradas sinônimas (MAURICIO *et al.*, 1999; HERWALDT, 2008).

A transmissão da doença ocorre através do repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos-palha infectadas (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Dois gêneros destes flebotomíneos estão envolvidos na transmissão da doença: *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, encontrados respectivamente em áreas do Velho e Novo Mundo. No Brasil, *Lutzomyia longipalpis*, descrita por Lutz e Neiva (1912), é a principal espécie transmissora (RANGEL & VILELA, 2008). Outra espécie, *Lu. cruzi*, também foi implicada na transmissão da leishmaniose visceral americana (DOS SANTOS *et al.*, 1998).

As espécies causadoras da leishmaniose visceral humana se distribuem amplamente no globo (tabela 1). Cerca de 90% de todos os casos registrados ocorrem em regiões rurais e suburbanas empobrecidas de Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2004). Na América Latina, foi registrado o primeiro caso de LV no Paraguai, em 1913, mas era possivelmente não-autóctone, provindo do Brasil, país onde está a maioria dos casos registrados na América Latina, contando com 90% deste

total (DESJEUX, 2001; BADARÓ & DUARTE, 2005). Grande parte dos casos de LV se localiza no Nordeste do país, seguindo as características geográficas de clima seco e áreas pobremente florestadas com vegetação xerófila (DESJEUX, 2001). Apesar de relacionadas a áreas rurais, epidemias recentes de LV foram registradas em cidades com mais de cem mil habitantes em diversos estados brasileiros, evidenciando seu processo de urbanização (COSTA, 2008).

**Tabela 1.** Espécies relacionadas à leishmaniose visceral humana. Adaptado (JERONIMO *et al.*, 2005).

<b><i>Leishmania</i> spp.</b>	<b>Localização</b>
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	Subcontinente Indiano, China, África Oriental e Sudão
<i>L. (L.) infantum/chagasi</i>	Ásia Ocidental, China, América Latina, Sul da Europa, Norte da África
<i>L. (L.) spp.</i>	África Oriental e Sudão
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Brasil (Bahia)
<i>L. (L.) tropica (rare)</i>	Ásia Ocidental, Subcontinente Indiano, Sul da Europa
<i>L. (L.) spp.</i>	África Oriental

Diferentes tipos epidemiológicos podem explicar o ciclo biológico do calazar. A transmissão pode ter caráter antroponótico, como ocorre na Índia de forma endêmica, onde o reservatório identificado é o homem, com vetor flebotomíneo bastante antropofílico (ciclo homem-flebotomo-homem); antrozoonótico, em que o cão é reservatório preferencial, como ocorre em zonas rurais do Brasil também como endemia, com o homem sendo eventualmente infectado pelos vetores pouco antropofílicos; ou de zoonose, na qual os animais são hospedeiros exclusivos (BADARÓ & DUARTE, 2005).

O controle da infecção no hospedeiro depende da resposta imune mediada por células. Uma das mais importantes características da resposta imune a *Leishmania* em camundongos é a polarização de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em subpopulações: T<sub>H</sub>1, ligada a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12; e T<sub>H</sub>2, ligada a produção de IL-10, IL-4 e IL-5

(SACKS *et al.*, 2008). A resolução e resistência à infecção seriam relacionadas à produção de citocinas  $T_H1$  e a susceptibilidade à produção de citocinas  $T_H2$ . Em humanos, contudo, esta polarização da resposta imunológica é difícil de determinar, uma vez que os níveis de citocinas secretadas são demasiadamente elevados no início da infecção (CALDAS *et al.*, 2005). Ainda assim, indivíduos podem cursar ou de forma assintomática onde níveis de IFN- $\gamma$  e resposta linfoproliferativa estão elevados, ou, em outro extremo, com níveis baixos de IFN- $\gamma$  e resposta linfoproliferativa reduzida (BACELLAR & CARVALHO, 2005). A citocina IL-10 é crucial na patogênese da LV humana, pois se contrapõe à atividade de IFN- $\gamma$  e IL-12, modulando respostas demasiadamente inflamatórias e lesivas aos tecidos do hospedeiro (BACELLAR & CARVALHO, 2005; NYLEN & SACKS, 2007).

A forma clássica da doença (calazar), onde a resposta celular é insuficiente – o que é bastante evidente quando há comorbidades como má nutrição ou infecção por HIV – se apresenta com sintomas de febre, perda de peso, esplenomegalia, pancitopenia (anemia, leucopenia e trombocitopenia) e por hipergamaglobulinemia decorrente da ativação de linfócitos B produtores de anticorpos (HERWALDT, 1999; BACELLAR & CARVALHO, 2005; JERONIMO *et al.*, 2005; SACKS *et al.*, 2008).

O diagnóstico é feito com base em dados clínicos e de confirmação laboratorial. O Ministério da Saúde do Brasil define casos suspeitos aqueles nos quais os indivíduos apresentam-se com febre e esplenomegalia e são provenientes de área com transmissão de LV. Ou indivíduos com essas características provenientes de área sem ocorrência de transmissão de LV, em que outros diagnósticos diferenciais tenham sido descartados (BRASIL, 2003). A confirmação é feita com através do encontro de parasitas em exame parasitológico direto (ou cultura), ou através de reação de imunofluorescência. Indivíduos clinicamente suspeitos de área endêmica, mesmo sem confirmação laboratorial, mas com resposta favorável ao teste terapêutico, podem também assumir a classificação de caso confirmado da doença (BRASIL, 2003;2006). O diagnóstico de gravidade da doença é dado quando os pacientes se pertencem a extremos etários ou quando estão presentes sinais de hemorragia, icterícia, anasarca, grave desnutrição e quando há comorbidades associadas (BRASIL, 2006).



O tratamento específico se faz com agentes antileishmânicos e assistência terapêutica de suporte, quando o quadro, muitas vezes grave, demanda (BRASIL, 2006). Classicamente os antimoniais pentavalentes ( $Sb^V$ ), usados para LV desde 1915, vêm sendo a primeira escolha para tratamento específico, porém níveis elevados de falha terapêutica no tratamento da LV antroponótica, efeitos adversos e a demanda de longo período de internação constituem desvantagens, apesar do baixo custo dessas medicações (BADARÓ & DUARTE, 2005; NASCIMENTO & MEDEIROS, 2005; VANLERBERGHE *et al.*, 2007). Em Bihar, estado indiano centro da epidemia de LV naquele país, índices de cura de apenas 35%, evidenciaram provável resistência do parasito (SUNDAR *et al.*, 2000). A anfotericina B desoxicolato é usado como alternativa para casos refratários (NASCIMENTO & MEDEIROS, 2005). A década de 1990 revolucionou o tratamento da LV, com novas drogas e uma nova formulação de uma anfotericina B lipossomal (BADARÓ & DUARTE, 2005). A anfotericina B lipossomal é uma droga com boa eficácia e menos efeitos adversos que a formulação clássica, contudo seu alto custo constitui um potencial problema para países em desenvolvimento (DAVIDSON *et al.*, 1991; BERMAN *et al.*, 1998). Além disso, são necessárias mais doses para tratar um paciente brasileiro do que um paciente do Quênia ou Índia com anfotericina B (BERMAN *et al.*, 1998). A miltefosina, um análogo da fosfocolina, com ação nas vias de sinalização celular, surgiu de estudos que demonstraram efeito leishmanicida (KUHLENCORD *et al.*, 1992). Esta droga com ótima eficácia em alguns estudos apresenta menos efeitos colaterais, é administrada por via oral e seu custo é aceitável mesmo para países mais pobres, (JHA *et al.*, 1999; BADARÓ & DUARTE, 2005; VANLERBERGHE *et al.*, 2007). No Brasil, porém, 50% dos pacientes com LV avaliados até o momento apresentaram falha terapêutica com a droga (DIETZE & LEMOS, 2009).

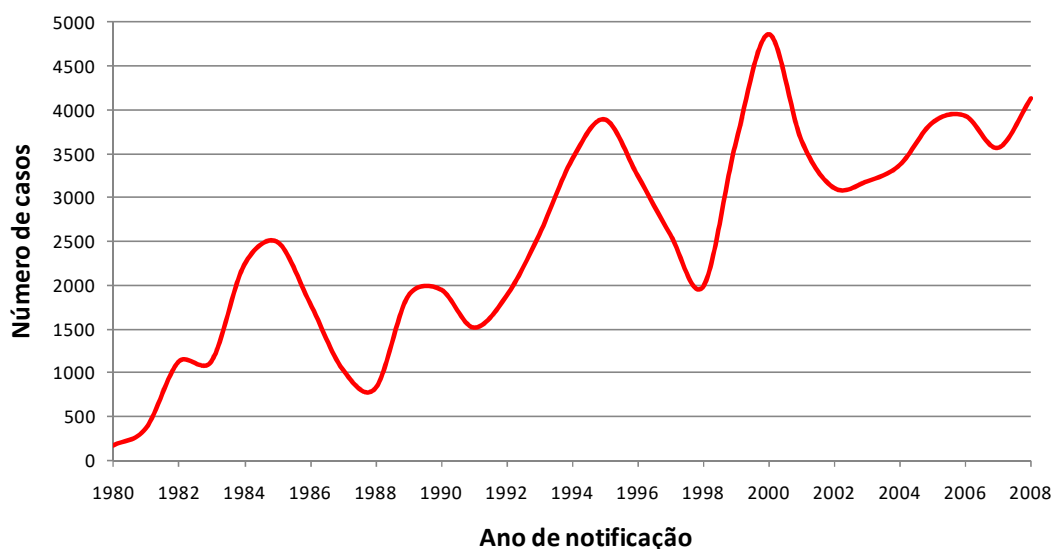
A maioria das mortes relacionadas a LV resultam de complicações infecciosas e hemorrágicas, daí a importância da compreensão dos mecanismos de desenvolvimento dessas complicações para o desenvolvimento de medidas terapêuticas e profiláticas eficazes para reduzir a letalidade associada à doença (BRASIL, 2006).

## 2.2 A LEISHMANIOSE VISCERAL COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

A leishmaniose visceral reemergiu nas últimas décadas de forma preocupante no Brasil e no mundo. Isto se deve à disseminação rápida para novas áreas, o aumento da letalidade associada à doença nessas áreas, ao aumento do número de casos e a coinfeção com o vírus HIV (BRASIL, 2006). Entre as doenças parasitárias, a LV é uma das doenças que resulta nas maiores taxas de mortalidade. São cerca de 50.000 mortes e 500.000 novos casos por ano no mundo, números somente ultrapassados pela malária (DESJEUX, 2001).

O Brasil registrou nos últimos quatro anos uma média de 3.800 casos por ano com uma letalidade média de 7,1% (BRASIL, 2009b). Além do aumento do número de casos nos últimos anos (figura 1), há importante subnotificação de casos de LV (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008). O cruzamento de informações de bancos de dados utilizados no Brasil pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mostrou que o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) possui, em relação ao Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) e ao Sistema de Informação Hospitalar (SIH), em média 43% de subnotificação de casos de LV (MAIA-ELKHOURY, 2005).

O fato de que a cura protege os indivíduos de novos episódios da enfermidade, mostra que é possível o desenvolvimento de uma vacina para LV (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Há, porém, demandas complexas para o desenvolvimento uma vacina contra a LV (CHAPPUIS *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil. 1980-2004: *Série histórica de casos e óbitos de doenças de notificação compulsória 1980-2005, SVS/SES/SINAN-MS*; 2005-2008: *TabNet: Casos confirmados por ano de notificação, acesso em 13 de outubro de 2009, SINAN-MS*<sup>1</sup>.

Dado o caráter zoonótico da LV americana, tendo o cão como principal reservatório urbano do parasito, o desenvolvimento de uma vacina contra a LVC teria um efeito imediato sobre a disseminação da doença (DYE, 1996) e serviria como modelo inicial para o desenvolvimento de uma vacina contra a LV humana. Não se dispõe, porém, de vacina adequada contra a LVC. Existem no momento duas vacinas contra a LVC em distribuição no Brasil, com registros provisórios no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, necessitando de testes definitivos sobre a sua eficácia (BRASIL, 2005b).

### 2.3 A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A leishmaniose visceral canina (LVC) foi descrita pela primeira vez na Tunísia por Nicole & Conte em 1908 (ASHFORD *et al.*, 1998) e, desde então, o cão tem sido considerado o principal reservatório da *L. infantum*/*L. chagasi* (ENSERINK, 2000; ZERPA

<sup>1</sup> A implantação com testes-piloto para uso do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) ocorreu em 1993 e fora regulamentado para uso em 1998 (LAGUARDIA *et al.*, 2004).

*et al.*, 2000; MORENO & ALVAR, 2002). Na América de Sul e no Mediterrâneo taxas de soroprevalência variam entre 20 e 30% (ASHFORD, 1996). No Brasil, especialmente em zonas endêmicas para LV da região nordeste do país altas taxas têm sido reportadas. Estudo realizado em Jequié (Bahia, Brasil) demonstrou soroprevalência de 43% em cães (DOS-SANTOS *et al.*, 2008).

A doença canina é de evolução lenta e início insidioso (BRASIL, 2003). Da mesma forma que em humanos, os cães infectados podem desenvolver uma doença sintomática resultando em morte, ou não, permanecendo assintomáticos ou com uma forma subclínica, com sintomas moderados (OLIVEIRA *et al.*, 1993; REIS *et al.*, 2006). Cães com a doença progressivamente desenvolvem manifestações que permitirão o diagnóstico clínico: linfadenopatia, mucosas descoradas, esplenomegalia, perda de peso, dermatite esfoliativa, ulcerações na pele, alopecia, onicogribose e ceratoconjutivites (CIARAMELLA *et al.*, 1997; BARROUIN-MELO *et al.*, 2006). A maioria de cães infectados naturalmente por *L. infantum*, analisados em um estudo retrospectivo, eram machos, mestiços e viviam ao ar livre (CIARAMELLA *et al.*, 1997).

No Brasil não há recomendação de tratamento do cão, algo que poderia não só aumentar a resistência dos poucos antibióticos disponíveis, mas reforçar a resistência da população à eutanásia, mantendo os cães como reservatórios de parasito (BRASIL, 2009a). A eutanásia de cães é indicada quando estes são soropositivos ou possuem exame parasitológico positivo e deve ser realizada com todos os devidos cuidados de mínimo sofrimento ao animal (BRASIL, 2005a).

As leishmanioses viscerais humana e canina compartilham de vários aspectos clínicos, exceto pelo comprometimento tegumentar mais exacerbado, presente na LVC (MORENO & ALVAR, 2002). O cão, apesar da sua importância como reservatório e modelo de doença, tem seus mecanismos imunológicos pouco estudados. A falta de marcadores imunológicos e reagentes para cães é um problema para o estudo da doença, extensamente pesquisada em murinos e humanos (MORENO & ALVAR, 2002; RUIZ *et al.*, 2005).

## 2.4 FUNÇÃO E ESTRUTURA ESPLÊNICA

O baço tem o tamanho aproximado de um punho fechado e é o maior órgão linfático humano. É considerado um órgão linfoide secundário, por não participar da geração direta de linfócitos. O órgão recebe cerca de 3% do débito cardíaco (WILLIAMS & LEGGETT, 1989). Em um dia, toda a população de linfócitos circulantes passa algumas dezenas de vezes no interior do seu parênquima, sendo o baço considerado o órgão mais importante para a recirculação de linfócitos (PABST & TREPEL, 1975). Está situado no quadrante superior esquerdo da cavidade abdominal e na esplenomegalia é a parte anterior da face diafragmática que se torna palpável abaixo do rebordo costal (BORLEY, 2004).

O trajeto do sangue que circula dentro do tecido esplênico ajuda a compreender a distribuição de suas populações celulares. O baço é o único órgão linfoide humano interposto na circulação sanguínea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Isto lhe confere a possibilidade de monitorar antígenos circulantes, através das suas células apresentadoras de antígenos, com consequente produção de anticorpos. Elimina, também, hemácias que estão destinadas a degradação (ROITT & DELVES, 2001; MEBIUS & KRAAL, 2005). Alterações físico-químicas ou do formato das hemácias, quando senescentes ou doentes, culminarão em sua fagocitose por macrófagos esplênicos (BRATOSIN *et al.*, 1998; MEBIUS & KRAAL, 2005).

A artéria e veia esplênicas entram através do hilo esplênico. No homem, os ramos que penetram o tecido esplênico se dividem para formar artérias trabeculares, que seguem o caminho das trabéculas, constituídas de tecido conjuntivo denso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Ao deixarem as trabéculas, as artérias são imediatamente envolvidas por uma bainha de linfócitos – na maioria, linfócitos T – e passam a ser chamadas de artérias centrais ou artérias da polpa branca. Essa bainha de linfócitos, por vezes, se espessa formando nódulos de tecido linfoide, em sua maioria linfócitos B. O prolongamento dessas artérias dá origem às chamadas artérias peniciladas que em seguida darão origem a capilares. A partir deste ponto sugere uma espécie de circulação aberta até o sangue fluir para a polpa vermelha (PV).

A polpa vermelha é formada pelos cordões esplênicos (de Billroth), local onde se processa boa parte da reciclagem de ferro das numerosas hemácias que lhe dão cor avermelhada durante a observação macroscópica (BRATOSIN *et al.*, 1998; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Os cordões são contínuos, de espessura variável e são constituídos por uma rede frouxa de células e fibras reticulares e revestidos por células endoteliais. Um marcador de superfície destas células do endotélio, a molécula de adesão MAdCAM-1 (do inglês *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*), permite observar a divisão entre a região folicular da polpa branca e a zona marginal adjacente (KRAAL & MEBIUS, 2006). Formam a polpa vermelha basicamente macrófagos, linfócitos, neutrófilos, plaquetas e eritrócitos, além de células do estroma (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Sua região adjacente à cápsula conjuntiva do baço é também um reservatório de monócitos, aptos a migrar para sítios inflamatórios (SWIRSKI *et al.*, 2009). Os macrófagos (M $\emptyset$ ) residentes nesses cordões são responsáveis por funções da polpa vermelha como a digestão de eritrócitos envelhecidos (MEBIUS & KRAAL, 2005). Os macrófagos de polpa vermelha (M $\emptyset$ PV) – que podem ser identificados pela expressão do antígeno F4/80, CD68 e de receptor de manose – são apenas uma das muitas populações de macrófagos do baço (TAYLOR *et al.*, 2005). Em camundongos, os M $\emptyset$ PV podem ainda ser encontrados em ilhotas de eritroblastos, células morfológicamente distintas dos outros macrófagos da PV (SONODA & SASAKI, 2008). M $\emptyset$ PV podem ainda assumir funções de macrófagos da polpa branca no curso de infecção por bactéria encapsulada, quando estes últimos forem perdidos (KIRBY *et al.*, 2009).

A polpa branca (PB), que à macroscopia aparece como pequenos nódulos esbranquiçados é dividida em três compartimentos anatomo-funcionais: a região periarteriolar de linfócitos (PALS), o folículo central (FOL) e a zona marginal (ZM). Quase todos os linfócitos T esplênicos se localizam na PALS. O FOL contém o centro germinativo (CG), onde ocorre expansão a clonal de linfócitos B determinada após o encontro com linfócitos T estimulados por antígeno, e, mais externamente, a zona do manto (MT), um adensado de linfócitos B *naïve* histologicamente identificável (WEILL *et al.*, 2009). A ZM rodeia as regiões linfóides e é considerada uma zona de transição

entre as polpas branca e vermelha, rica em macrófagos e linfócitos B (MEBIUS & KRAAL, 2005; KRAAL & MEBIUS, 2006).

Na PALS, as células T prontamente interagem com células apresentadoras de antígenos (APC). Os linfócitos T reconhecem antígenos ligados ao MHC das APC e respondem a esse estímulo com liberação de citocinas, iniciando as respostas a patógenos intracelulares ou, em colaboração com linfócitos B, a proteínas externas ao ambiente celular (JANEWAY *et al.*, 2001).

Há grande quantidade de linfócitos B no FOL e na ZM. Estes linfócitos são células respondedoras que possuem em sua superfície o complexo BCR (do inglês *B cell receptor*), composto por cadeias de imunoglobulinas (Ig) capazes de reconhecer antígenos diversos. As moléculas Ig $\alpha$  (CD79 $\alpha$ ) e Ig $\beta$  (CD79 $\beta$ ), associadas ao complexo, funcionam como transdutoras de sinais ao interior celular (JANEWAY *et al.*, 2001; ABBAS & LICHTMAN, 2003). As células B do folículo (BFOL) são geralmente menores e recirculam continuamente, características opostas às dos linfócitos B da zona marginal (BZM), que também são ligeiramente mais longevos (KRAAL & MEBIUS, 2006). Além da cooperação com linfócitos T, descrita acima, células BFOL podem ser ativadas por antígenos microbianos, de forma T independente, o que induzirá proliferação ou secreção de IgM (ALLMAN & PILLAI, 2008). Células BZM podem, da mesma forma, responder a estímulos dependentes ou não de apresentação T e geralmente se diferenciarão em células secretoras de anticorpos (PILLAI *et al.*, 2005). O que parece controlar a seleção de linfócitos B para as diferentes regiões esplênicas após o contato com células T é sua afinidade de ligação ao antígeno (PAUS *et al.*, 2006; CHAN *et al.*, 2009).

Os macrófagos também compõem outra grande porção das células da ZM. Os macrófagos de zona marginal (M $\emptyset$ ZM) reconhecem antígenos que se ligarão a receptores lectina tipo C e receptores de estrutura colágena (CAMBI *et al.*, 2005; KRAAL & MEBIUS, 2006). O que distingue a população destes M $\emptyset$ ZM é justamente a combinação destes dois receptores, responsáveis por grande parte da triagem de antígenos da ZM, já que estes macrófagos se distribuem amplamente por este

compartimento em íntima relação com BZM (KRAAL & MEBIUS, 2006). Já os macrófagos metalofílicos marginais (MØMM) são células que expressam grande quantidade de sialoadesina (SIGLEC1) e estão localizados em porções mais internas da ZM (KRAAL & MEBIUS, 2006).

O estroma dos compartimentos da polpa branca do baço é composto por variado número de células. Duas delas merecem atenção. Células fibroblásticas reticulares (FRC), associadas à PALS e as células dendríticas foliculares (FDC), associadas às regiões de células B, participam de apresentação antigênica e de mecanismos de retenção de linfócitos, não sendo consideradas apenas arcabouço de sustentação (MUELLER & GERMAIN, 2009). A interação dessas células reticulares com os linfócitos da polpa branca esplênica é determinante para sua localização e sobrevivência (MEBIUS, 2007). A indução mediada por linfotóxina para que FDC produzam CXCL13 atraindo células B (CD79 $\alpha^+$ ) para o interior do folículo e FRC estimulem células T (CD3 $^+$ ) através da produção de CCL19 e CCL21 na região periarteriolar é indispensável à manutenção estrutural destas duas regiões esplênicas (MEBIUS & KRAAL, 2005).

## **2.5 O BAÇO NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Os parasitos do complexo *L. donovani* são viscerotrópicos e acometem o sistema reticuloendotelial, notadamente o baço. Em cães infectados naturalmente, formas amastigotas de *Leishmania* são facilmente encontradas povoando células mononucleares esplênicas (BARROUIN-MELO *et al.*, 2006). Há aumento progressivo do tamanho do órgão e a contagem de parasitos é maior quanto mais grave é a infecção (OLIVEIRA *et al.*, 1993; BARROUIN-MELO *et al.*, 2006).

A simples palpação do baço no exame físico continua sendo um bom marcador regressão da doença em pacientes que estão sendo tratados. A esplenomegalia, medida em centímetros do rebordo costal esquerdo, regride significativamente nos



primeiros 30 dias após iniciado o tratamento (CALDAS *et al.*, 2005). Esta redução pode ser de 40% ou mais e é usada como um critério de cura (BRASIL, 2003). Em crianças, o achado de esplenomegalia está presente em 97% daquelas que foram internadas para tratamento (QUEIROZ *et al.*, 2004). Uma complicação comum da esplenomegalia é o hiperesplenismo, que além de ser um dos fatores que contribuem para a pancitopenia se relaciona com sequestro esplênico agudo, uma complicação grave que pode terminar com choque hipovolêmico e morte (FAUCI *et al.*, 2008).

Outra importante característica histológica do comprometimento esplênico na LV é a desorganização do tecido linfóide esplênico (SANTANA *et al.*, 2008) com alterações na distribuição de populações celulares. Como a LV altera a distribuição das populações celulares do baço, desorganizando o tecido linfóide? De fato, há atrofia da polpa branca, notadamente no compartimento FOL (SANTANA *et al.*, 2008). Nesta região e na PALS células do estroma regulam importantes mecanismos de residência de células efectoras e células apresentadoras de antígenos (MUELLER & GERMAIN, 2009).

Na leishmaniose visceral, as células estromais FDC são progressivamente perdidas no FOL (SMELT *et al.*, 1997). Esta perda é quase completa e acompanhada de intenso parasitismo de MØ da polpa branca (SMELT *et al.*, 1997). Além de produtoras de quimioatraentes para leucócitos, estas FDC fixam complemento e aprisionam antígenos que mais tarde podem ser usados pelas APC para posterior apresentação antigênica a linfócitos (MUELLER & GERMAIN, 2009). As FDC são responsáveis por mecanismos de retenção de linfócitos B (MUELLER & GERMAIN, 2009). A destruição de FDC poderia também implicar em redução no número de linfócitos B nas regiões foliculares, uma vez que há atrofia dessa região. A homeostase de células B, que requer a quimiocina CXCL13 produzido no FOL pelas FDC para sua manutenção, parece estar comprometida, pois há redução na sua síntese por esplenócitos (DADOS DO GRUPO, NÃO PUBLICADOS).

Outra subpopulação de células estromais, as FRC, são igualmente importantes. Na LV experimental em camundongos foi possível observar que também há perda de

células FRC (gp38<sup>+</sup>) e concomitante diminuição na expressão de CCR7 em células dendríticas (DC), com implicação direta na resposta mediada por células T (ATO *et al.*, 2002). Tanto linfócitos T quando células DC expressam este receptor de quimiocina, o CCR7, ligante das quimiocinas CCL19 e CCL21 produzidas por FRC (MUELLER & GERMAIN, 2009). A interação entre APC DC e linfócitos T no compartimento PALS é necessária ao desenvolvimento de resposta celular é possível imaginar que redução na expressão de CCR7 por células T ou DC comprometa esta interação, já que os dois tipos celulares poderiam ser insuficientemente recrutados para este compartimento da polpa branca.

A manutenção estrutural da ZM e a organogênese de tecidos linfóides é dependente de sinalização mediada citocinas da família TNF (DE TOGNI *et al.*, 1994; COOK *et al.*, 1998; PILLAI *et al.*, 2005; RANDALL *et al.*, 2008). Assim, muitos dos mecanismos de redistribuição de populações esplênicas estão de alguma forma relacionados a citocinas deste grupo: TNF- $\alpha$  e linfotóxina (MEBIUS & KRAAL, 2005).

Em camundongos susceptíveis à LV infectados por *L. donovani* há perda de MØZM, desorganização da distribuição habitual de outras populações de MØ e menor retenção esplênica de linfócitos injetados por via intravenosa (ENGWERDA *et al.*, 2002). Demonstrou-se que este fenômeno é dependente de TNF- $\alpha$ , já que em camundongos infectados o excesso de produção da citocina observada na infecção de animais normais é acompanhado de maior perda de MØZM do naqueles que não a produzem constitucionalmente (ENGWERDA *et al.*, 2002).

A linfotóxina possui três formas, dependendo da sua distribuição em trímeros: LT $\alpha_1\beta_2$  e LT $\alpha_2\beta_1$ , que são ligadas a membrana e LT $\alpha_3$ , secretada como proteína solúvel. Há interação entre linfócitos que as expressam e células estromais para a produção de quimiocinas (CXCL13, CCL19, CCL21) ligadas à residência nos sítios correspondentes (MEBIUS & KRAAL, 2005; KRAAL & MEBIUS, 2006). Apesar de ainda não estudada na LV, modelos murinos de infecção por *L. major* sugerem um papel importante das linfotóxicas na resistência ao patógeno. Em animais que não as expressavam houve

pior controle dos parasitos, com baixa produção de citocinas envolvidas na resolução da infecção, como INF- $\gamma$  e IL-12 (XU *et al.*, 2007).

Todas estas alterações anatomo-funcionais esplênicas na LV, algo também observado no curso de infecções virais (BENEDICT *et al.*, 2006), acabam comprometendo sua função como órgão linfoide.

## 2.6 ALTERAÇÕES ESPLÊNICAS EM OUTRAS DOENÇAS

A ausência do tecido esplênico está associada a infecções, fato há muito tempo observado (MORRIS & BULLOCK, 1919). Infecções severas, definidas como infecção seguida de hospitalização, são mais comuns em pacientes esplenectomizados, sendo maior o risco de desenvolvê-las quanto mais idoso for o paciente e maior for o tempo transcorrido desde a cirurgia para a retirada do baço (KYAW *et al.*, 2006). Este último estudo, uma coorte com 1648 pacientes, revelou as causas comuns para esplenectomia, listadas na tabela 2.

**Tabela 2.** Incidência de primo-infecção por motivos de esplenectomia. Adaptado de KYAW *et al.*, 2006.

Motivo da esplenectomia	Nº	Primo-infecção severa pós-esplenectomia	
		Nº (%)	Taxa <sup>2</sup> por 100 pessoas-ano
Trauma ( <i>e.g.</i> , acidente automobilístico)	271	36 (13.3)	3.12 (2.25-4.32)
Terapêutica, sem malignidade ( <i>e.g.</i> , baço pélvico com sintoma)	246	71 (28.9)	10.16 (8.05-12.82)
Terapêutica, com malignidade ( <i>e.g.</i> , púrpura trombocitopênica)	530	94 (17.7)	12.08 (9.87-14.79)
Iatrogênica, sem malignidade ( <i>e.g.</i> , iatrogenia em cirurgia eletiva)	447	91 (20.4)	4.81 (3.91-5.90)
Iatrogênica, com malignidade ( <i>e.g.</i> , ressecção TU periesplênico)	143	55 (38.5)	13.26 (10.18-17.27)

<sup>2</sup> 95% IC, Intervalo de Confiança

Cursam com esplenomegalia e alterações estruturais do tecido esplênico: linfomas de zona marginal esplênica e outros tumores metastáticos ou não; leucemias mieloides crônicas; doença de Gaucher, quando macrófagos repletos de lipídios não degradados serão a causa da esplenomegalia, infecções diversas como leptospirose, esquistossomose e malária; só citando algumas (ASTER, 2004).

O comprometimento do tecido esplênico com conseqüente perda de resposta adequada a bactérias encapsuladas pode ser consistente com perda anatômica (como na esplenectomia após trauma) ou funcional (como o que ocorre na anemia falciforme, com infartos esplênicos repetidos e perda de tecido normal). Pacientes asplênicos ou que irão ser submetidos a algum procedimento para retirada do baço devem ser vacinados para pneumococos (BRASIL, 2001).

### 3. OBJETIVO

#### GERAL

Identificar populações celulares envolvidas no processo de desorganização do tecido esplênico.

#### ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um método de morfometria levando em consideração as características estruturais do tecido esplênico;
2. Testar os métodos de morfometria na identificação de alterações quantitativas das populações celulares em um modelo de leishmaniose visceral;
3. Correlacionar os dados obtidos com outros marcadores de susceptibilidade ou resistência na leishmaniose visceral canina: presença, ou não, de *Leishmania (L.) chagasi* em cultura esplênica associada com a apresentação, ou não, de reação de hipersensibilidade tardia).

#### 4. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é responsável por cerca de 50.000 mortes por ano em todo mundo e está em expansão, principalmente em áreas periurbanas (DESJEUX, 2004; COSTA, 2008). O cão, além de ser o principal reservatório natural de *Leishmania chagasi/infantum* (ASHFORD *et al.*, 1998; MAURICIO *et al.*, 1999), constitui um importante modelo biológico para o estudo da doença humana. Estima-se que intervenções que reduzam a quantidade de cães capazes de transmitir a doença, através de vacina, teriam um forte impacto sobre a enfermidade humana (DYE, 1996). Conhecer então os mecanismos celulares que levam a resposta imune protetora contra a LV tem importância para a escolha racional de preparados antigênicos e adjuvantes a serem utilizados como candidatos vacinais.

Uma vez que a desorganização do tecido esplênico observada na leishmaniose visceral canina (TRYPHONAS *et al.*, 1977; SANTANA *et al.*, 2008) poderia se relacionar a respostas imunológicas insuficientes (JUNT *et al.*, 2008; SANTANA *et al.*, 2008), buscaremos estudar a redistribuição das principais populações celulares do baço relacionadas ao processo de desestruturação do tecido linfóide esplênico na infecção naturalmente adquirida.

As alterações nas populações esplênicas podem estar relacionadas com o desenvolvimento de uma síndrome inflamatória-infecciosa permanente que têm como desfecho um aumento na morbidade e mortalidade que ocorre nos casos graves da LV.

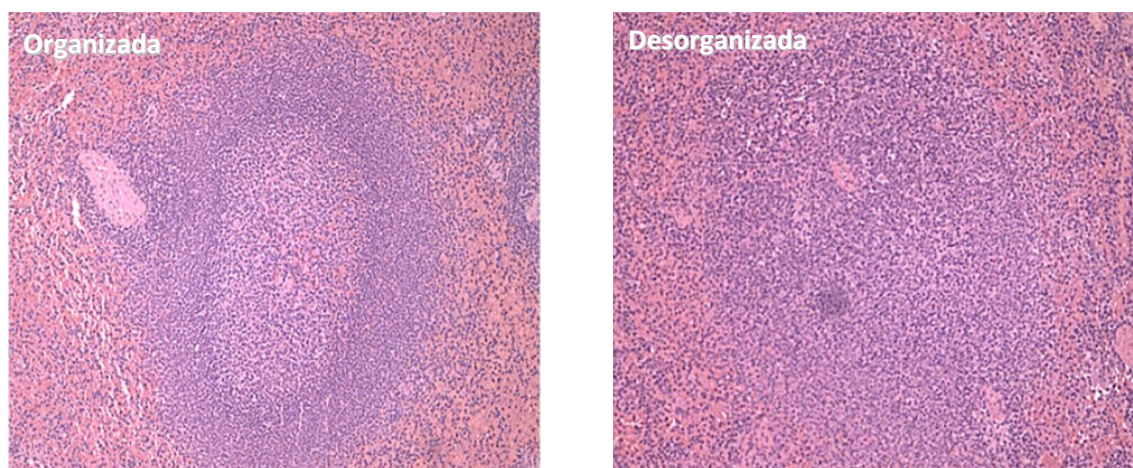
## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAL E ESPÉCIMES

Este é um estudo retrospectivo baseado em espécimes histológicos e registros experimentais arquivados no Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, Bahia, Brasil). Os espécimes histológicos representam fragmentos de baço obtidos de cães que foram coletados nas ruas de uma área endêmica para LV (Jequié, Bahia, Brasil) entre 2004 e 2008, em colaboração com o Programa de Vigilância de Doenças Endêmicas da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. As amostras de tecido esplênico foram cortadas transversalmente à cápsula, fixadas em formalina a 10% e incluídos em parafina. Neste estudo, foram incluídos animais com resultados de sorologia para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, cultura esplênica para detecção do parasito e teste cutâneo da leishmanina (TCL). Detalhes sobre a realização desses testes foram publicados, previamente, por nosso grupo (PARANHOS-SILVA *et al.*, 1998; BALEEIRO *et al.*, 2006; DOS-SANTOS *et al.*, 2008). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a Lei n.º 11.794 de 2008, pautada pelo Decreto n.º 6.899 de 2009, que regulamentam a utilização de animais em pesquisa no Brasil. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais da Fundação Oswaldo Cruz.

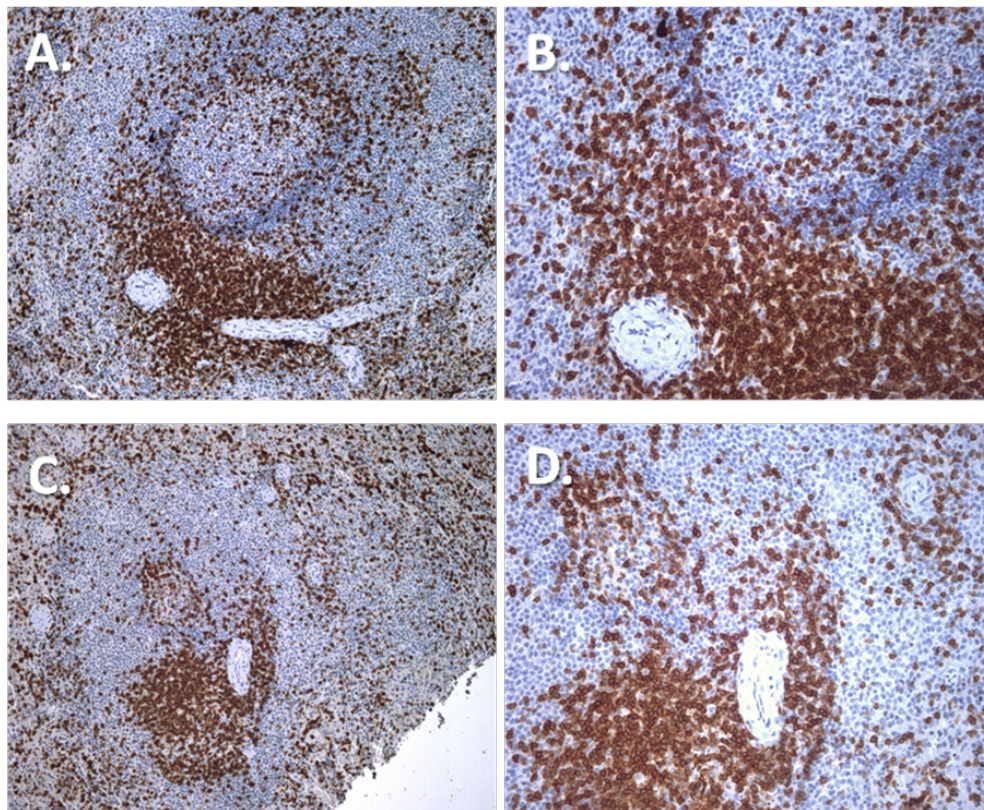
Secções do tecido esplênico foram cortadas com a espessura de 4,0 µm e coradas com hematoxilina e eosina (HE) e examinadas por microscopia óptica convencional, para seleção dos animais para a constituição dos grupos experimentais. Os espécimes foram classificados quanto à organização da polpa branca utilizando os critérios definidos previamente (SANTANA *et al.*, 2008): (a) bem organizado, apresentando bainha periarteriolar de linfócitos (PALS), centro germinativo (CG), zona do manto (MT) e zona marginal (ZM) distintos; (b) levemente desorganizado, que apresenta mudanças hipoplásicas ou hiperplásicas levando a uma perda de definição

de algumas regiões da polpa branca; (c) moderadamente desorganizado, quando a polpa branca está evidente, mas suas regiões são pobremente individualizadas e distintas; e (d) extensivamente desorganizado, quando a estrutura folicular está raramente distinta da polpa vermelha e área exclusiva de células T. Apenas animais classificados nas categorias de tecido linfoide esplênico bem organizado (referidos, neste estudo, como animais com tecido esplênico organizado) ou como moderadamente ou intensamente desorganizado (referidos, neste estudo, como animais com tecido esplênico desorganizado), por constituírem grupos polares, foram incluídos neste estudo. A figura 2 mostra aspectos histológicos representativos dessas duas categorias de animais. Foi realizada fenotipagem das células proliferantes e dos linfócitos B e T do baço utilizando-se os anticorpos anti-Ki67, anti-CD79 $\alpha$  e anti-CD3, utilizando procedimento descrito (RUIZ *et al.*, 2005). As secções marcadas foram submetidas ao sistema morfométrico objeto deste estudo, descrito em detalhes a seguir. As figuras 3, 4 e 5 mostram os aspectos característicos dessas marcações.

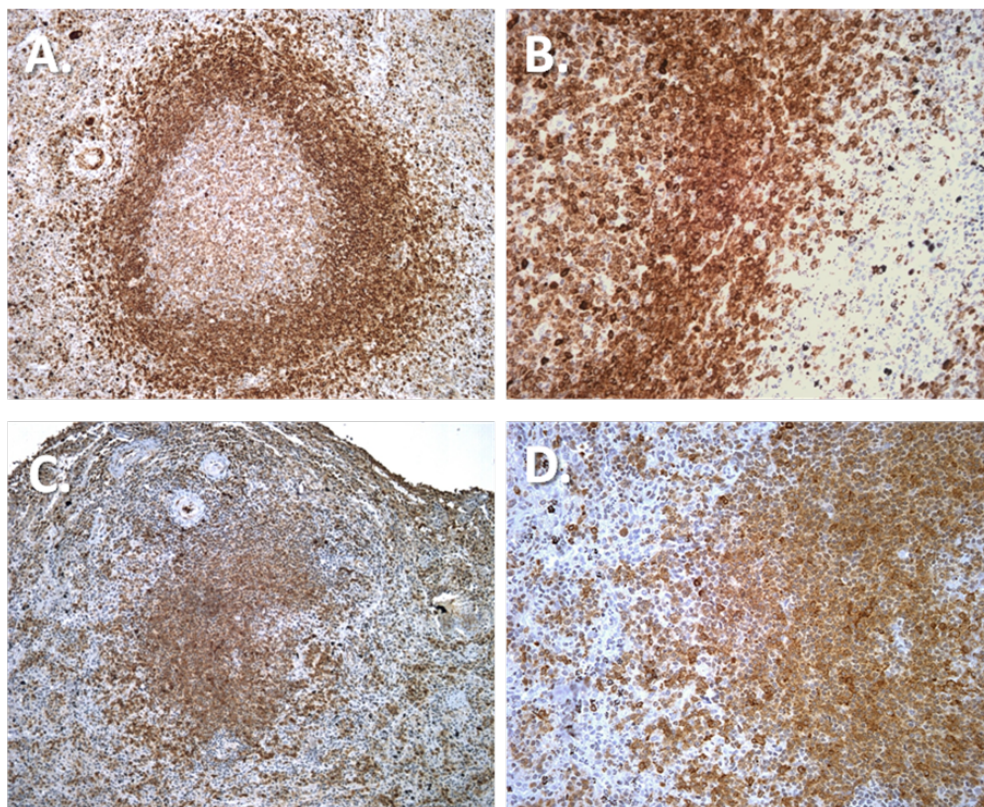


**Figura 2. Microfotografias representativas de polpa branca organizada e desorganizada (200X).** Em animais com tecido linfoide esplênico organizado claramente se observa os distintos compartimentos da polpa branca.



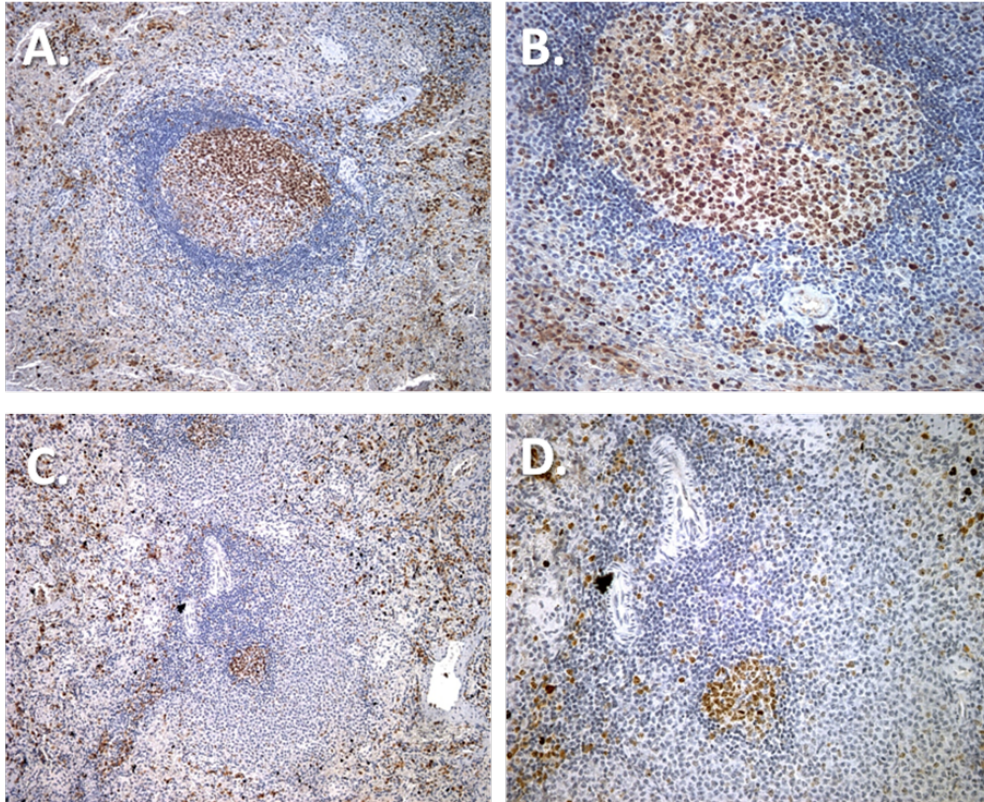


**Figura 3.** Fotos representativas da marcação anti-CD3. A e B, polpa branca organizada. C e D, polpa branca desorganizada. Aumentos de 200X (A e C) ou 400X (B e D).



**Figura 4.** Fotos representativas da marcação anti-CD79 $\alpha$ . A e B, polpa branca organizada. C e D, polpa branca desorganizada. Aumentos de 200X (A e C) ou 400X (B e D).





**Figura 5.** Fotos representativas da marcação anti-Ki-67. A e B, polpa branca organizada. C e D, polpa branca desorganizada. Aumentos de 200X (A e C) ou 400X (B e D).

## 5.2 MODELO DE ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES DO BAÇO

Todas as regiões de polpa branca de cada um dos espécimes corados com imuno-histoquímica foram fotografadas em toda a sua extensão (aumentos de 100X ou 200X). Para minimizar os erros de mensuração decorrentes da incidência do corte sobre as regiões da polpa branca, foi feita uma mensuração preliminar da área completa de polpa branca e selecionadas as cinco maiores representações dessas regiões.

A densidade de células de cada população estudada presentes em cada uma das regiões de PB (FOL, ZM ou PALS) foi estimada realizando-se uma contagem do número de células em áreas representadas por fotografias não sobrepostas (aumento de 400X). Cinco áreas não sobrepostas escolhidas aleatoriamente da polpa vermelha

foram fotografadas, com aumento de 400X, para estimativa semelhante da densidade celular (Fórmula 1). Os resultados dessas contagens foram expressos em número de células por milímetro quadrado de tecido (densidade da população celular).

Fórmula 01:

$$\sum Dc = Nc \div A$$

Onde:  $Dc$  = densidade celular;  $Nc$  = número de células;  $A$  = área

Para uma estimativa da celularidade média por secção dos diferentes compartimentos da PB, esses compartimentos (FOL, ZM e PALS) foram mensurados a partir de fotografias daquelas cinco maiores regiões de PB representadas nos espécimes de cada animal, e a densidade celular foi multiplicada pela área medida do compartimento correspondente (Fórmula 2). Exemplos de regiões definidas na polpa branca para estudo estão representados na figura 6. Para a estimativa da densidade das populações celulares da PB de cada animal utilizou-se soma da celularidade média de cada compartimento da PB, dividido pela área da PB correspondente (Fórmula 3).

Fórmula 02:

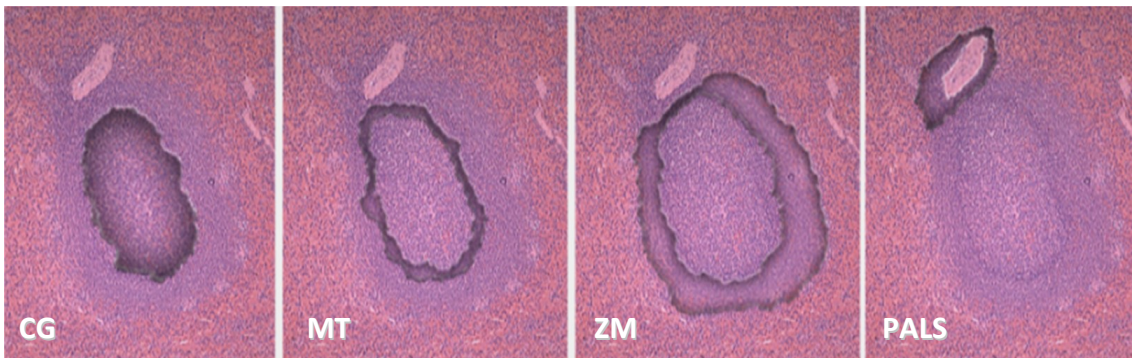
$$Cm = Dc \times Ac$$

Onde:  $Cm$  = celularidade média;  $Dc$  = densidade celular;  $Ac$  = área do compartimento.

Fórmula 03:

$$Dc_{PB} = (Cm_{FOL} + Cm_{ZM} + Cm_{PALS}) \div A_{PB}$$

Onde:  $Dc_{PB}$  = densidade celular da polpa branca;  $Cm_{FOL}$  = celularidade média do FOL;  $Cm_{ZM}$  = celularidade média da ZM;  $Cm_{PALS}$  = celularidade média da PALS.



**Figura 6. Compartimentos esplênicos definidos para morfometria.** A região folicular (FOL) é dividida em centro germinativo (CG) e zona do manto (MT). Compõem ainda a polpa branca a zona marginal (ZM) e a região periarteriolar de linfócitos (PALS).

Para uma estimativa de diferenças relativas na distribuição das populações celulares na PV e PB dos grupos de animais em estudo, com aumento de 40X foram determinadas as áreas de polpa branca e de polpa vermelha de no mínimo três fotografias por espécime de animal. A área relativa de PV e PB foi estabelecida para cada espécime pela divisão da área de cada região pela área total de mensuração (Fórmula 4). A área relativa de PV ou PB foi multiplicada pela densidade de células de cada população estimada para cada região (Fórmula 5).

Fórmula 04:

$$Ar = A \div At$$

Onde:  $Ar$  = área relativa da região ( $Ar_{PB}$  ou  $Ar_{PV}$ );  $A$  = área absoluta da região ( $A_{PB}$  ou  $A_{PV}$ );  $At$  = área total na qual foi efetuada a mensuração.

Fórmula 05:

$$Cr = Dc \div Ar$$

Onde:  $Cr$  = celularidade relativa da região ( $Cr_{PB}$  ou  $Cr_{PV}$ );  $Dc$  = densidade celular ( $Dc_{PB}$  ou  $Dc_{PV}$ );  $Ar$  = área relativa da região ( $Ar_{PB}$  ou  $Ar_{PV}$ ).

Todas as fotografias foram capturadas com a resolução de 1280 por 1024 *pixels* usando uma câmera de captura acoplada a um microscópio ótico CX41 (Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram obtidas e analisadas com auxílio do programa Image-Pro Plus versão 6.0 (MediaCybernetics, Bethesda, Estados Unidos). Os valores obtidos nessas mensurações foram exportados para planilhas eletrônicas para análise.

### **5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os valores expressos nos gráficos referentes à morfometria representam médias aritméticas (com respectivos desvios padrões) dos valores absolutos ou relativos das estimativas realizadas sobre a variável em questão. A análise da significância estatística os grupos foi determinada através do teste não paramétrico de Mann-Whitney, já que não há normalidade das distribuições. O valor crítico para significância dos resultados foi estabelecido para  $P < 0,05$ . Os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Estados Unidos).

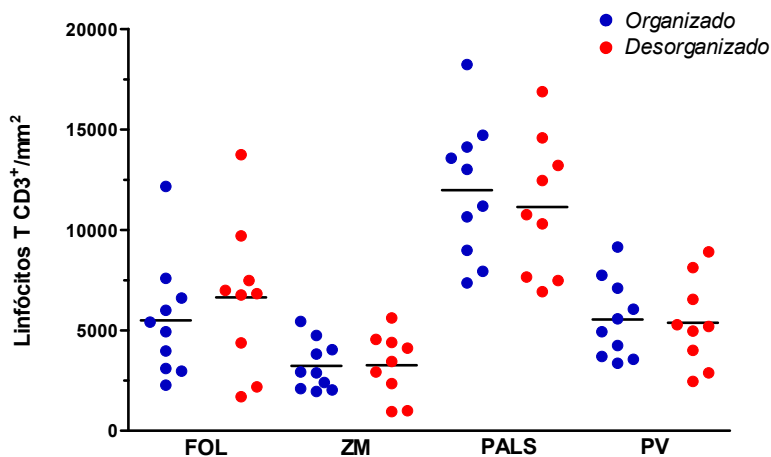
## 6. RESULTADOS

### 6.1 DENSIDADE CELULAR

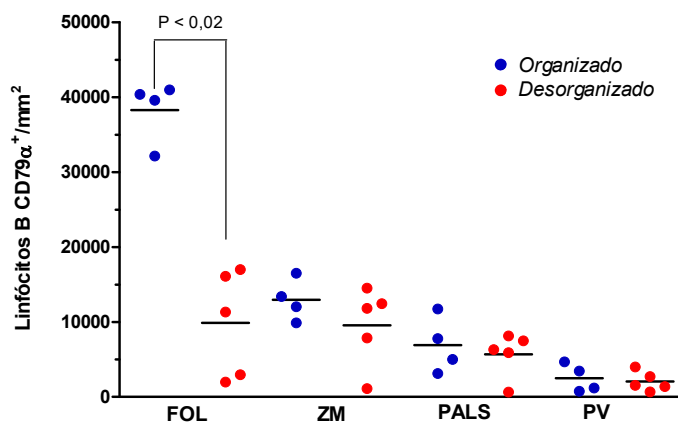
A densidade de linfócitos T (células CD3<sup>+</sup>) foi maior na região PALS que nos outros compartimentos do tecido esplênico em animais com tecido linfoide organizado ou desorganizado. No entanto, não houve diferença nas densidades de linfócitos T entre os dois grupos de animais nas diferentes regiões da polpa branca ou na polpa vermelha (figura 7).

A densidade de células B (CD79 $\alpha$ <sup>+</sup>) foi maior nos folículos linfóides de cães com tecido linfoide esplênico organizado ( $38.264 \pm 4.113$  células/mm<sup>2</sup>) que nos folículos linfóides de animais com tecido esplênico desorganizado ( $9.870 \pm 7.101$  células/mm<sup>2</sup>, teste Mann-Whitney,  $P < 0,02$ ). Não houve diferenças na densidade de linfócitos B nos demais compartimentos do tecido esplênico entre os dois grupos de animais em estudo (figura 8).

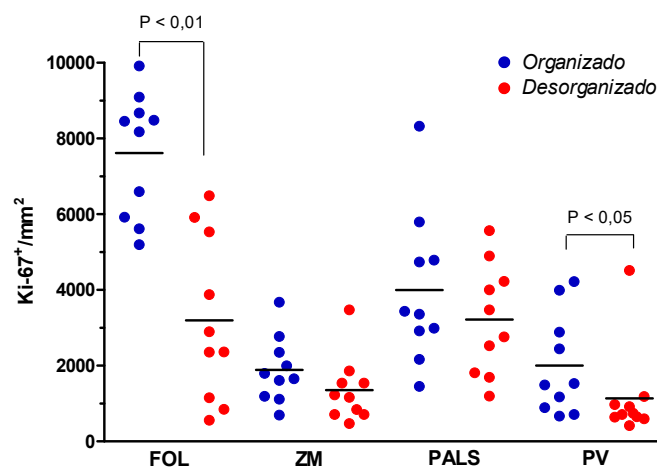
A densidade de células proliferantes (células Ki-67<sup>+</sup>) foi maior no FOL de animais com polpa branca esplênica organizada ( $7.613 \pm 1.638$ ) células/mm<sup>2</sup> do que em animais com polpa branca esplênica desorganizada ( $3.199 \pm 2.167$  células/mm<sup>2</sup>, teste Mann-Whitney,  $P < 0,01$ ). Também a densidade de células em proliferação foi maior na polpa vermelha dos animais com tecido esplênico organizado ( $2.000 \pm 1.321$  células/mm<sup>2</sup>) que na polpa vermelha dos animais com tecido esplênico desorganizado ( $1.136 \pm 1.207$  células/mm<sup>2</sup>, teste Mann-Whitney,  $P < 0,05$ ). Apesar de haver tendência de diminuição da densidade de células proliferantes em ZM e PALS nos baços com polpa branca desorganizada, essa diferença não foi estatisticamente significativa (figura 9).



**Figura 7. Densidade de células T.** Número de células CD3<sup>+</sup> por mm<sup>2</sup> nos diferentes compartimentos do baço de animais com tecido esplênico organizado e desorganizado. Teste Mann-Whitney,  $P < 0,05$ .



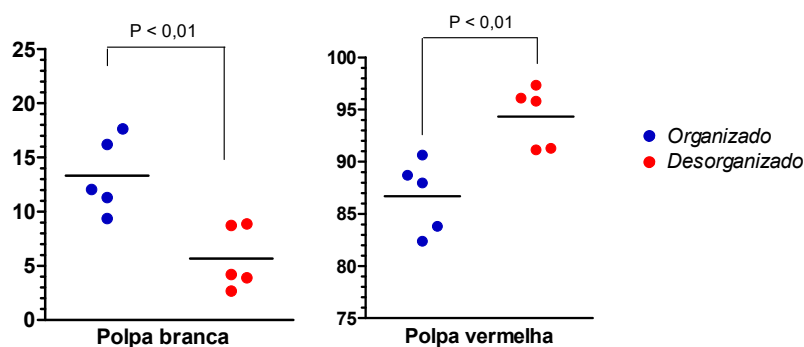
**Figura 8. Densidade de células B.** Número de células CD79 $\alpha^+$  por mm<sup>2</sup> nos diferentes compartimentos do baço de animais com tecido esplênico organizado e desorganizado. Teste Mann-Whitney,  $P < 0,05$ . FOL = folículo, ZM = zona marginal e PALS = região periarteriolar.



**Figura 9. Densidade de células proliferantes.** Número de células Ki67<sup>+</sup> por mm<sup>2</sup> nos diferentes compartimentos do baço de animais com tecido esplênico organizado e desorganizado. Teste Mann-Whitney,  $P < 0,05$ . FOL = folículo, ZM = zona marginal e PALS = região periarteriolar.

## 6.2 PROPORÇÃO DAS ÁREAS DE POLPA VERMELHA E POLPA BRANCA NOS BAÇOS COM TECIDO LINFOIDE ORGANIZADO OU DESORGANIZADO

A proporção de áreas de polpa branca em relação à secção esplênica total foi maior nos animais com tecido esplênico organizado ( $13,3 \pm 3,5\%$ ) que nos animais com tecido linfóide esplênico desorganizado ( $5,6 \pm 2,9\%$ , teste Mann-Whitney,  $P < 0,01$ ) representando, portanto, redução de cerca de 2,35 vezes da área correspondente à polpa branca em animais com tecido desorganizado (figura 10).



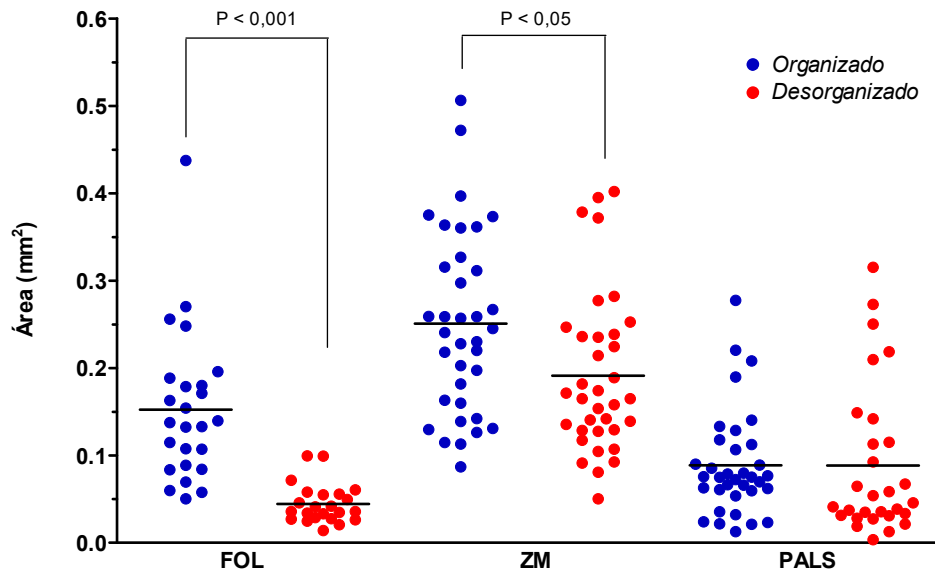
**Figura 10.** Percentual da área total correspondente à polpa vermelha e à polpa branca do baço de animais com tecido esplênico organizado e desorganizado. Teste Mann-Whitney,  $P < 0,05$ .

## 6.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS COMPARTIMENTOS DA POLPA BRANCA EM ANIMAIS COM TECIDO ESPLÊNICO ORGANIZADO OU DESORGANIZADO

Foi observada uma redução significativa da área dos folículos nos animais com a desorganização do tecido linfóide esplênico ( $0,04 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ ) em relação aos animais com o tecido esplênico preservado ( $0,15 \pm 0,08 \text{ mm}^2$ , teste Mann-Whitney,  $P < 0,01$ ). Também foi observada uma diminuição da área da zona marginal nos animais com tecido esplênico desorganizado ( $0,19 \pm 0,09 \text{ mm}^2$ ), em relação à zona marginal dos animais com tecido esplênico organizado ( $0,25 \pm 0,10 \text{ mm}^2$ , teste Mann-Whitney,  $P <$



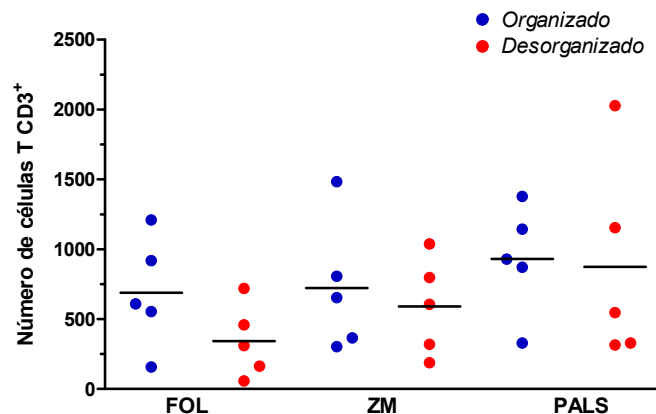
0,02). A área da região periarteriolar foi similar entre os dois grupos de animais (figura 11).



**Figura 11.** Áreas, em mm<sup>2</sup>, dos diferentes compartimentos da polpa branca esplênica (FOL, ZM e PALS) de cinco folículos de cinco animais. Teste Mann-Whitney, P < 0,05. FOL = folículo, ZM = zona marginal e PALS = região periarteriolar.

#### 6.4 NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS POR SECÇÃO NOS COMPARTIMENTOS DA POLPA BRANCA

Desde que a densidade de células nos diferentes compartimentos do tecido esplênico oferece apenas uma visão parcial da distribuição das populações celulares no baço, procuramos refinar a quantificação dessas populações corrigindo pela área ocupada pelos diferentes compartimentos do baço. Não houve diferença no número de linfócitos T (CD3) nas diferentes regiões do tecido esplênico entre os dois grupos de animais (figura 12).

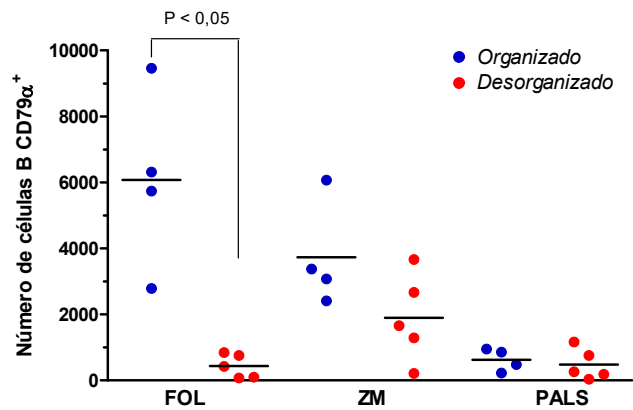


**Figura 12.** Número total de células T CD3 em cada compartimento esplênico. Os valores correspondem às densidades corrigidas pela média das áreas totais de cada compartimento. Teste Mann-Whitney,  $P < 0,05$ . FOL = folículo, ZM = zona marginal e PALS = região periarteriolar.

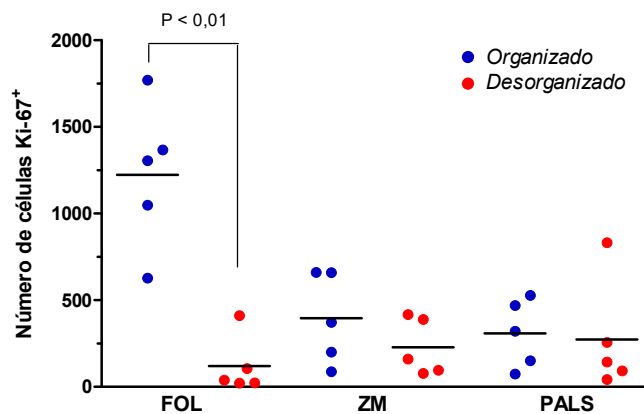
O número de células B ( $CD79\alpha^+$ ) foi maior nos folículos de cães com tecido esplênico organizado ( $6.073 \pm 2.737$  células) que nos folículos de cães com tecido esplênico desorganizado ( $438 \pm 357$  células,  $P < 0,02$ ; figura 13). O número de células proliferantes ( $Ki-67^+$ ) foi maior nos folículos de cães com tecido esplênico organizado ( $1.223 \pm 421$  células) do que em folículos de cães com tecido esplênico desorganizado ( $119 \pm 166$  células, teste Mann-Whitney,  $P < 0,01$ , figura 14).

## 6.5 NÚMERO RELATIVO DE CÉLULAS NA POLPA VERMELHA E NA POLPA BRANCA DE ANIMAIS COM TECIDO LINFOIDE ESPLÊNICO ORGANIZADO OU DESORGANIZADO

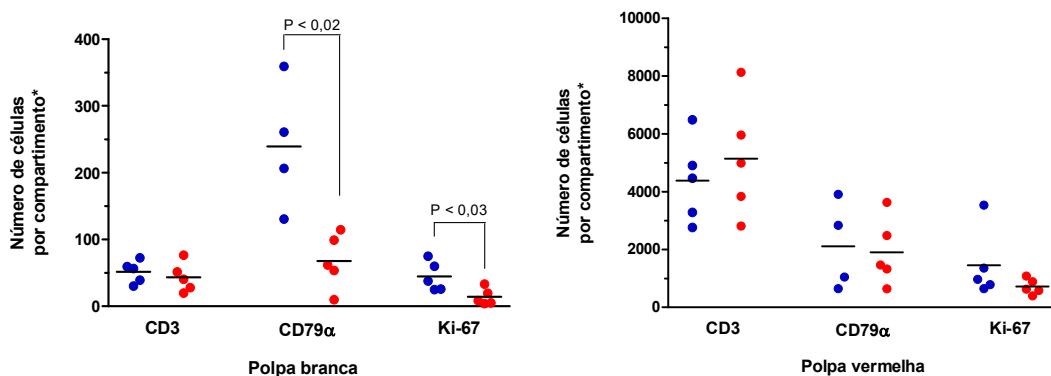
Comparando-se a distribuição das diferentes populações celulares em relação às áreas de polpa branca e de polpa vermelha nos animais com tecido linfóide esplênico organizado ou desorganizado observou-se um maior número relativo de linfócitos B nos baços de cães com tecido esplênico organizado (de  $239,1 \pm 96,06$ ) que nos baços com tecido esplênico desorganizado células ( $67,65 \pm 41,10$  células, teste Mann-Whitney,  $P < 0,02$ ). O número relativo de células proliferantes foi maior nos animais com tecido esplênico organizado (de  $44,54 \pm 22,07$ ) que nos animais com tecido linfóide esplênico desorganizado ( $13,98 \pm 12,27$ , teste Mann-Whitney,  $P = 0,03$ ) (figura 15).



**Figura 13.** Número total de células B CD79 $\alpha$  em cada compartimento esplênico. Os valores correspondem às densidades corrigidas pela média das áreas totais de cada compartimento. Teste T Mann-Whitney,  $P < 0,05$ . FOL = folículo, ZM = zona marginal e PALS = região periarteriolar.



**Figura 14.** Número total de células proliferantes em cada compartimento esplênico. Os valores correspondem às densidades corrigidas pela média das áreas totais de cada compartimento. Teste T Mann-Whitney,  $P < 0,05$ . FOL = folículo, ZM = zona marginal e PALS = região periarteriolar.



**Figura 15.** Número relativo de células em cada compartimento esplênico. (\*polpa branca e polpa vermelha) por folículo, por animal. Teste Mann-Whitney,  $P < 0,05$ .

## 7. DISCUSSÃO

O método de análise morfométrica proposto foi eficiente para demonstrar que tanto células proliferantes quanto linfócitos B estão reduzidos na polpa branca de animais com tecido linfoide esplênico desorganizado. A diminuição destas células, à custa de sua redução em folículos principalmente é evidenciada tanto pela redução de densidade quanto do tamanho absoluto da área folicular. Foi possível ainda prever a quantidade total de células em regiões específicas, algo que poderá ser aplicado em trabalhos futuros utilizando outros marcadores. Temos poucos espécimes analisados. Algumas diferenças que não foram comprovadas poderão ficar evidentes com o aumento da amostra.

Há ausência de anticorpos para imuno-histoquímica específicos para cães (MORENO & ALVAR, 2002). Anticorpos que se ligam à proteína Ki-67 podem evidenciar indiretamente a expansão clonal de linfócitos e já são bem estabelecidos na prática médica, principalmente no reconhecimento de tumores proliferantes (SCHOLZEN & GERDES, 2000). Da mesma forma, os anticorpos anti-CD79 $\alpha$  e anti-CD3 usados para identificar células B e T em humanos podem ser adequadamente usados em cães (RUIZ *et al.*, 2005).

Há redução absoluta, evidenciada pela estimativa do número de células, e relativa, evidenciada pela redução da densidade celular, de linfócitos B e células proliferantes nos folículos de animais com tecido desorganizado. Não sabemos se as células proliferantes são realmente linfócitos B que deixaram de sofrer expansão clonal, e se esses linfócitos B são realmente (1) células B locais do folículo (BFOL) ou (2) células B de zona marginal (BZM) ou outra subpopulação de células B que por algum motivo migraram para folículo.

E as alterações encontradas? Como elas podem ser interpretadas? Alterações arquiteturais do baço – associadas à perda, à substituição ou redistribuição de populações celulares – ocorrem comumente no curso da infecção por leishmanias viscerotrópicas em cães e camundongos (ATO *et al.*, 2002; ENGWERDA *et al.*, 2002;

SANTANA *et al.*, 2008). Outros quadros infecciosos, principalmente aqueles envolvidos com micro-organismos que atingem fagócitos mononucleares, cursam com desestruturação do tecido linfoide esplênico (BENEDICT *et al.*, 2006). De fato, nosso grupo já havia determinado semi-quantitativamente uma atrofia nos compartimentos de polpa branca em animais com tecido desorganizado (SANTANA *et al.*, 2008). Neste estudo, a atrofia da polpa branca esplênica é confirmada pela diminuição de cerca de duas vezes na relação entre a polpa branca e polpa vermelha (de  $15,5 \pm 4,7\%$  para  $6,1 \pm 3,3\%$ ) nos cães com tecido linfoide esplênico desorganizado, e redução no tamanho do folículo e, menos intensamente, no tamanho na ZM. Dados semelhantes demonstram atrofia de polpa branca associada com infecção por *Leishmania* em camundongos (VERESS *et al.*, 1983), em humanos (VERESS *et al.*, 1977) e cães naturalmente infectados (SANTANA *et al.*, 2008).

Duas fases explicam a expansão mitótica de linfócitos B. Uma primeira fase ocorre quando há contato primário entre linfócitos B *naïve* e imunógenos. Após esta primeira fase, em que linfócitos B de memória são clonalmente selecionados, uma resposta secundária pode ser desenvolvida e ainda mais células diferenciadas para secreção de anticorpos são geradas em um segundo contato com antígenos (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Um dado interessante é que a própria presença de linfócitos B é crucial para a estrutura linfoide não só do FOL, mas da ZM e da PALS (NGO *et al.*, 2001; NOLTE *et al.*, 2004).

Como já havia sido previamente descrito que a desorganização esplênica está relacionada a quadros mais graves de LV (SANTANA *et al.*, 2008), é possível que as alterações esplênicas aqui observadas estejam relacionadas à imunossupressão e a uma resposta ineficiente a infecções bacterianas. Em cães com formas avançadas de LV são observadas inúmeras lesões de pele, muitas delas de caráter purulento (pústulas) além de conjuntivite. Estudar a correlação entre as alterações aqui encontradas e marcadores de resistência ou susceptibilidade será pertinente em próximas etapas do trabalho.

Em conjunto, nossos resultados mostram que alterações arquiteturais esplênicas estão associadas com alterações na distribuição de populações celulares no baço. Tais alterações estão potencialmente envolvidas na geração de susceptibilidade a infecções bacterianas e à própria *Leishmania infantum* que ocorrem nos estágios avançados da LV.

## 8. CONCLUSÕES

1. A sistemática de mensuração desenvolvida permitiu esta identificação de alterações na distribuição de populações celulares no baço na LVC;
2. A redistribuição de populações celulares do baço, em especial de células B e de células proliferantes está relacionada com a desorganização do tecido esplênico e com a atrofia da polpa branca em cães de uma área endêmica para Leishmaniose;
3. Essa desorganização do tecido linfoide atinge predominantemente a zona marginal e a formação de folículos.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Cellular and Molecular Immunology*. 5ª. ed. Londres: Saunders, 2003.
- ALLMAN, D.; PILLAI, S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol*, v. 20, n. 2, p. 149-57, 2008.
- ANDRADE, T. M.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, v. 162, n. 6, p. 1354-9, 1990.
- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M. *et al.* Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v. 59, n. 1, p. 53-7, 1998.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol*, v. 14, n. 5, p. 523-32, 1996.
- ASTER, J. Diseases of white blood cells, lymph nodes, spleen, and thymus. In: KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. (Org.). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7ª. ed. Filadélfia: Saunders, 2004.
- ATO, M.; STAGER, S.; ENGWERDA, C. R. *et al.* Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol*, v. 3, n. 12, p. 1185-91, 2002.
- BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. *Gaz. Méd. Bahia*, v. 75, n. 1, p. 24-34, 2005.
- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (calazar). In: FOCACCIA, R. (Org.). *Veronesi: Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 2005.
- BALEEIRO, C. O.; PARANHOS-SILVA, M.; DOS SANTOS, J. C. *et al.* Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. *Vet Parasitol*, v. 139, n. 1-3, p. 21-8, 2006.
- BARROUIN-MELO, S. M.; LARANGEIRA, D. F.; SANTOS, S. O. *et al.* A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 111, n. 3-4, p. 251-61, 2006.
- BENEDICT, C. A.; DE TREZ, C.; SCHNEIDER, K. *et al.* Specific remodeling of splenic architecture by cytomegalovirus. *PLoS Pathog*, v. 2, n. 3, p. e16, 2006.



BERMAN, J. D.; BADARO, R.; THAKUR, C. P. *et al.* Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ*, v. 76, n. 1, p. 25-32, 1998.

BORLEY, N. R. Pancreas, spleen and suprarenal gland. In: STANDRING, S. (Org.). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 39<sup>a</sup>. ed. Londres: Churchill Livingstone, 2004.

BRASIL. *Manual de Procedimentos para Vacinação*. 4<sup>a</sup>. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

\_\_\_\_\_. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. 1<sup>a</sup>. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

\_\_\_\_\_. *Guia de Vigilância Epidemiológica - Leishmaniose visceral*. 6<sup>a</sup>. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005a.

\_\_\_\_\_. *Nota técnica - Vacina anti-leishmaniose visceral canina Leishmune®*. Brasília: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005b.

\_\_\_\_\_. *Leishmaniose Visceral Grave - Normas e Condutas*. 1<sup>a</sup>. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

\_\_\_\_\_. *II Fórum de discussão sobre o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC)*. Brasília: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009a.

\_\_\_\_\_. *TabNet SINAN: casos confirmados e óbitos por ano de notificação. Acesso em 13 de outubro de 2009*. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009b.

BRATOSIN, D.; MAZURIER, J.; TISSIER, J. P. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*, v. 80, n. 2, p. 173-95, 1998.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D. *et al.* Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis*, v. 5, p. 113, 2005.

CAMBI, A.; KOOPMAN, M.; FIGDOR, C. G. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol*, v. 7, n. 4, p. 481-8, 2005.

CHAN, T. D.; GATTO, D.; WOOD, K. *et al.* Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J Immunol*, v. 183, n. 5, p. 3139-49, 2009.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, v. 5, n. 11, p. 873-82, 2007.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, v. 141, n. 21, p. 539-43, 1997.

COOK, M. C.; KORNER, H.; RIMINTON, D. S. *et al.* Generation of splenic follicular structure and B cell movement in tumor necrosis factor-deficient mice. *J Exp Med*, v. 188, n. 8, p. 1503-10, 1998.

COSTA, C. H. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*, v. 24, n. 12, p. 2959-63, 2008.

DAVIDSON, R. N.; CROFT, S. L.; SCOTT, A. *et al.* Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Lancet*, v. 337, n. 8749, p. 1061-2, 1991.

DE TOGNI, P.; GOELLNER, J.; RUDDLE, N. H. *et al.* Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science*, v. 264, n. 5159, p. 703-7, 1994.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 95, n. 3, p. 239-43, 2001.

\_\_\_\_\_. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

DIETZE, R.; LEMOS, E. M. Avaliação da sensibilidade in vitro à Miltefosina de cepas de *Leishmania chagasi* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose visceral - Resumo - Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas - PRPPG/UFES. 2009. Disponível em: <<http://portais.ufes.br/PRPPG/projetos&progr=30001013010P0>>. Acesso em: 5 de novembro de 2009.

DOS-SANTOS, W. L.; JESUS, E. E.; PARANHOS-SILVA, M. *et al.* Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 123, n. 3-4, p. 251-9, 2008.

DOS SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A. *et al.* Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, v. 12, n. 3, p. 315-7, 1998.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*, v. 55, n. 2, p. 125-30, 1996.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; COTTERELL, S. E. *et al.* A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am J Pathol*, v. 161, n. 2, p. 429-37, 2002.

ENSERINK, M. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science*, v. 290, n. 5498, p. 1881-3, 2000.

FAUCI, A.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D. *et al. Harrison Medicina Interna*. 17<sup>a</sup>. ed. São Paulo: McGraw-Hill Professional, 2008.

HERWALDT, B. Leishmaniose. In: FAUCI, A.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D. *et al* (Org.). *Harrison Medicina Interna*. 17<sup>a</sup>. ed. São Paulo: McGraw-Hill Professional, 2008.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, n. 9185, p. 1191-9, 1999.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *et al. Immunobiology*. 6<sup>a</sup>. ed. Nova Iorque: Garland Publishing, 2001.

JERONIMO, S. M. B.; SOUSA, A. D. Q.; PEARSON, R. D. Leishmania Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucocutaneous Leishmaniasis. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Org.). *Mandell, Bennett, & Dolin: Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6<sup>a</sup>. ed. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2005.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P. *et al.* Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med*, v. 341, n. 24, p. 1795-800, 1999.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica - Texto e Atlas*. 11<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUNT, T.; SCANDELLA, E.; LUDEWIG, B. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 10, p. 764-75, 2008.

KIRBY, A. C.; BEATTIE, L.; MAROOF, A. *et al.* SIGNR1-negative red pulp macrophages protect against acute streptococcal sepsis after *Leishmania donovani*-induced loss of marginal zone macrophages. *Am J Pathol*, v. 175, n. 3, p. 1107-15, 2009.

KRAAL, G.; MEBIUS, R. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol*, v. 250, p. 175-215, 2006.

KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H. *et al.* Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 36, n. 8, p. 1630-4, 1992.

KYAW, M. H.; HOLMES, E. M.; TOOLIS, F. *et al.* Evaluation of severe infection and survival after splenectomy. *Am J Med*, v. 119, n. 3, p. 276 e1-7, 2006.

LAGUARDIA, J.; DOMINGUES, C. M. A.; CARVALHO, C. *et al.* Sistema de informação de agravos de notificação em saúde (Sinan): desafios no desenvolvimento de um sistema de informação em saúde. *Epidemiol Serv Saúde*, v. 13, n. 3, p. 135-146, 2004.

MAIA-ELKHOURY, A. N. *Avaliação dos Registros de Morbimortalidade da Leishmaniose Visceral em Sistemas de Informações do SUS.* (2005). (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

MAIA-ELKHOURY, A. N.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica*, v. 24, n. 12, p. 2941-7, 2008.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R. *et al.* Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, v. 119 ( Pt 3), p. 237-46, 1999.

MEBIUS, R. E. Lymphoid organogenesis: Educating stroma. *Immunol Cell Biol*, v. 85, n. 2, p. 79-80, 2007.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*, v. 5, n. 8, p. 606-16, 2005.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MORRIS, D. H.; BULLOCK, F. D. The Importance of the Spleen in Resistance to Infection. *Ann Surg*, v. 70, n. 5, p. 513-21, 1919.

MUELLER, S. N.; GERMAIN, R. N. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol*, v. 9, n. 9, p. 618-29, 2009.

NASCIMENTO, E. L. T.; MEDEIROS, I. M. Leishmaniose visceral (calazar). In: TAVARES, W.; MARINHO, A. C. (Org.). *Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias.* 2ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NGO, V. N.; CORNALL, R. J.; CYSTER, J. G. Splenic T zone development is B cell dependent. *J Exp Med*, v. 194, n. 11, p. 1649-60, 2001.

NOLTE, M. A.; ARENS, R.; KRAUS, M. *et al.* B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. *J Immunol*, v. 172, n. 6, p. 3620-7, 2004.

NYLEN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*, v. 28, n. 9, p. 378-84, 2007.

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

PABST, R.; TREPEL, F. The predominant role of the spleen in lymphocyte recirculation. I. Homing of lymphocytes to and release from the isolated perfused pig spleen. *Cell Tissue Kinet*, v. 8, n. 6, p. 529-41, 1975.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MELRO, M. C. *et al.* Cohort study on canine emigration and Leishmania infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop*, v. 69, n. 1, p. 75-83, 1998.

PAUS, D.; PHAN, T. G.; CHAN, T. D. *et al.* Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med*, v. 203, n. 4, p. 1081-91, 2006.

PILLAI, S.; CARIAPPA, A.; MORAN, S. T. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*, v. 23, p. 161-96, 2005.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *Jornal de Pediatria*, v. 80, p. 141-146, 2004.

RANDALL, T. D.; CARRAGHER, D. M.; RANGEL-MORENO, J. Development of secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*, v. 26, p. 627-50, 2008.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*, v. 24, n. 12, p. 2948-52, 2008.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C. *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*, v. 146, n. 2, p. 303-11, 2006.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. *Roitt's Essential Immunology*. 10<sup>a</sup>. ed. Malden: Blackwell Publishing, 2001.

RUIZ, F. S.; ALESSI, A. C.; CHAGAS, C. A. *et al.* Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 41, p. 263-270, 2005.

SACKS, D. L.; SHER, A.; RILEY, E. M. *et al.* The Immune Response to Parasites. In: PAUL, W. E. (Org.). *Fundamental Immunology*. 6<sup>a</sup>. ed. Londres: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A. *et al.* Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol*, v. 30, n. 10, p. 515-24, 2008.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, v. 182, n. 3, p. 311-22, 2000.

SMELT, S. C.; ENGWERDA, C. R.; MCCROSSEN, M. *et al.* Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J Immunol*, v. 158, n. 8, p. 3813-21, 1997.

SONODA, Y.; SASAKI, K. Surface morphology of the central macrophages of erythroblastic islets in the spleen of aged and pregnant mice: an immunohistochemical light microscopic study. *Arch Histol Cytol*, v. 71, n. 3, p. 155-61, 2008.

SUNDAR, S.; MORE, D. K.; SINGH, M. K. *et al.* Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*, v. 31, n. 4, p. 1104-7, 2000.

SWIRSKI, F. K.; NAHRENDORF, M.; ETZRODT, M. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, v. 325, n. 5940, p. 612-6, 2009.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M. *et al.* Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, v. 23, p. 901-44, 2005.

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

VANLERBERGHE, V.; DIAP, G.; GUERIN, P. J. *et al.* Drug policy for visceral leishmaniasis: a cost-effectiveness analysis. *Trop Med Int Health*, v. 12, n. 2, p. 274-83, 2007.

VERESS, B.; ABDALLA, R. E.; EL HASSAN, A. M. Visceral spreading depletion of thymus-dependent regions and amyloidosis in mice and hamsters infected intradermally with *Leishmania* isolated from Sudanese cutaneous leishmaniasis. *Br J Exp Pathol*, v. 64, n. 5, p. 505-14, 1983.

VERESS, B.; OMER, A.; SATIR, A. A. *et al.* Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. *Immunology*, v. 33, n. 5, p. 605-10, 1977.

WEILL, J. C.; WELLER, S.; REYNAUD, C. A. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*, v. 27, p. 267-85, 2009.

WILLIAMS, L. R.; LEGGETT, R. W. Reference values for resting blood flow to organs of man. *Clin Phys Physiol Meas*, v. 10, n. 3, p. 187-217, 1989.

XU, G.; LIU, D.; FAN, Y. *et al.* Lymphotoxin alpha beta 2 (membrane lymphotoxin) is critically important for resistance to *Leishmania* major infection in mice. *J Immunol*, v. 179, n. 8, p. 5358-66, 2007.

ZERPA, O.; ULRICH, M.; NEGRON, E. *et al.* Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 94, n. 5, p. 484-7, 2000.