
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

DE *Leishmania (L.) amazonensis*

ISOLADA DE UM GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)

DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Isabele dos Reis Martins Duarte,¹ Carla Cardozo Pinto de Arruda,² Ana Rachel Oliveira Andrade,² Vânia Lúcia Brandão Nunes,¹ Alda Izabel de Souza,¹ Doroty Mesquita Dourado¹ e Sylvio Celso Gonçalves da Costa³

RESUMO

Embora os principais reservatórios mamíferos de *Leishmania* descritos nas Américas sejam roedores, gambás, endentados, equinos, caninos e primatas, tem-se discutido o papel do gato como hospedeiro de *Leishmania* em razão do encontro de felinos infectados nos últimos anos. Este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento histopatológico das lesões características de leishmaniose cutânea em camundongos infectados, com uma amostra de *Leishmania amazonensis* isolada de um gato em Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul, Brasil. A avaliação histopatológica foi realizada de acordo com a intensidade e a composição do infiltrado inflamatório e a quantidade de parasitos. O estudo mostrou um elevado grau de parasitismo cutâneo na pata 20 dias após a infecção dos camundongos, demonstrando a elevada e rápida infectividade da amostra. Associado à infecção, foi observado um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, eosinofílico intenso e difuso e necrose moderada e difusa. É importante salientar que, no gato de origem, não foram detectadas doenças com características imunossupressoras. Não se verificou a ocorrência de visceralização, uma vez que não foram observados parasitos no fígado e no baço. Apesar disso, constatou-se reação inflamatória focal e perivasculær no fígado.

DESCRITORES: *Leishmania amazonensis*. Gato. Modelo murino. Histopatologia.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença caracterizada por lesões de pele, cartilagem e mucosas do trato respiratório superior, causada

- 1 Laboratório de Parasitologia Humana. Centro de Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde. Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal/Anhanguera-UNIDERP. Campo Grande, MS.
- 2 Laboratório de Parasitologia. Departamento de Patologia. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS.
- 3 Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Rio de Janeiro, RJ.

Endereço para contato: E-mail: cardozoc@nin.ufms.br

Recebido para publicação em: 2/10/2009. Revisto em: 22/2/2010. Aceito em: 9/3/2010.

por protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) e transmitida ao homem pela picada de insetos flebotomíneos (Gontijo & Carvalho, 2003). Nos últimos anos, tem aumentado o número de casos e ampliado sua ocorrência geográfica. Atualmente é encontrada em todos os estados brasileiros sob diferentes perfis epidemiológicos (Basano & Camargo, 2004, Brasil, 2007). A multiplicidade de espécies do parasito, de insetos vetores e de animais reservatórios em diferentes ambientes propicia a existência de várias modalidades clinicoepidemiológicas da infecção (Marzochi & Marzochi, 1994). Uma das espécies causadoras da LTA no Brasil é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsável pelas formas cutânea, cutâneo-mucosa e cutâneo-difusa, esta última considerada o polo anérgico da LTA (Barral et al., 1991).

Embora os principais reservatórios mamíferos de *Leishmania* descritos nas Américas sejam roedores, gambás, endentados, equinos, caninos e os primatas, tem-se discutido o papel do gato como hospedeiro de *Leishmania* em virtude do encontro de vários felinos infectados nos últimos anos. A leishmaniose cutânea é a forma mais frequentemente encontrada nos felinos e vem sendo descrita em vários países, inclusive no Brasil (Brumpt, 1936; Mello, 1940; Passos et al., 1996; Schubach et al., 2003, 2004; Souza et al., 2005, 2009; Simões-Mattos et al., 2005). Os sinais clínicos são inespecíficos e incluem lesões nodulares ou ulceradas (no focinho, lábios, orelhas e pálpebras) e alopecia (Mancianti, 2004). Conforme consta na literatura, os gatos infectados geralmente apresentam envolvimento dos linfonodos e do sangue, indicando a disseminação de *Leishmania* nos hospedeiros felinos. O papel epidemiológico do gato não está ainda bem claro por causa da ausência de estudos com base no xenodiagnóstico (Mancianti, 2004). Acredita-se que esta espécie apresente um alto grau de resistência natural ao parasito, como se observou em infecção experimental (Simões-Mattos et al., 2005). Alguns gatos afetados eram positivos para o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou vírus da leucemia felina (FeLV), e tanto essas viroses quanto o estresse podem induzir danos à resposta imunológica mediada por células (Grevot et al., 2005). Apesar disso, a resistência do gato à leishmaniose pode depender também de fatores genéticos não relacionados à resposta celular (Mancianti, 2004).

Este trabalho teve como objetivo verificar, no modelo murino, o comportamento histopatológico das lesões cutâneas induzidas por uma amostra de *L. (L.) amazonensis* isolada de um gato do Mato Grosso do Sul (Souza et al., 2009). Este estado vem se confirmando como área endêmica de leishmaniose cutânea e visceral (Brasil, 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss Webster* com idade de 4 a 6 semanas, fêmeas, provenientes do biotério da Anhanguera-Uniderp, livres de patógenos específicos e alimentados *ad libitum*. O experimento foi aprovado pela

Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal.

Parasitas e infecção experimental

Foi utilizada uma amostra de *L. (L.) amazonensis* isolada de lesão cutânea de um gato (*Felis catus*) proveniente da cidade de Ribas do Rio Pardo, estado do Mato Grosso do Sul. O animal apresentava lesões ulceradas no focinho e nódulos nas bordas das duas orelhas (Souza et al., 2009). A amostra foi identificada após isolamento em meio de cultivo axênico, pela técnica de anticorpos monoclonais (Shaw et al., 1989), no Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. Desde o isolamento até a infecção murina experimental, a cepa foi mantida *in vivo* através de cinco passagens seriadas em hamsters (*Mesocricetus auratus*), realizadas de quatro em quatro meses. Para a infecção dos camundongos, uma suspensão de formas amastigotas foi inoculada (0,05mL) por via subcutânea no coxim plantar das patas anteriores esquerdas de quatro camundongos. Os animais foram observados semanalmente e aqueles nos quais apareceram lesões no local da inoculação foram eutanasiados por indução em câmara de CO₂ e necropsiados para retirada das patas lesionadas. Depois de 60 dias da infecção, dois animais foram necropsiados, após a eutanásia, para retirada do fígado e do baço e verificação de possível visceralização.

Estudo histopatológico

Fragmentos de pele das patas e das vísceras foram fixados em formalina a 10% tamponada até o processamento histológico, que consistiu em clivagem, processamento histotécnico, inclusão em parafina histológica e corte de 4 µm de espessura. Após a desparafinização em estufa, os cortes foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) e examinados em microscópio de campo claro com objetivas de 10x, 40x e 100x.

As alterações observadas foram avaliadas quanto à intensidade e composição do infiltrado inflamatório e à quantidade de parasitos.

RESULTADOS

No presente estudo, foram observadas nos camundongos lesões cutâneas compatíveis com a LTA a partir de 20 dias após a inoculação com *L. (L.) amazonensis*. O estudo histopatológico das lesões cutâneas das patas mostrou intenso parasitismo na derme, com a presença de muitas formas amastigotas no interior de macrófagos (Figura 1). Observou-se infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, eosinofílico intenso e difuso (Figura 2) associado a necrose moderada e difusa (Figura 3). Foram observados alguns mastócitos (Figura 2).

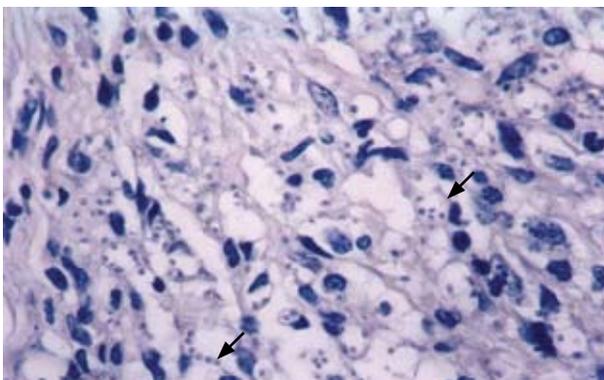


Figura 1. Derme (pata de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis*, 20 dias após a inoculação do parasito): formas amastigotas no interior de macrófagos (setas). HE, obj. 40x.

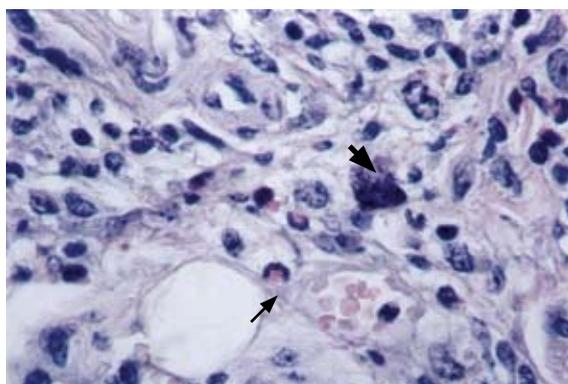


Figura 2. Infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, eosinofílico (seta fina) intenso e difuso na pata de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis*, 20 dias após a inoculação do parasito. Observam-se mastócitos no infiltrado (seta grossa). HE, obj. 100x.

No fígado dos camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis*, verificou-se que o parênquima hepático apresentava aspecto normal. Foram observados infiltrados inflamatórios discretos, perivascularares, de natureza mononuclear com a presença de eosinófilos (Figura 4). Da mesma forma, observou-se infiltrado inflamatório focal discreto e mononuclear, com grande quantidade de eosinófilos (Figura 5). Os baços observados apresentaram aspecto microscópico normal da polpa branca e da polpa vermelha.

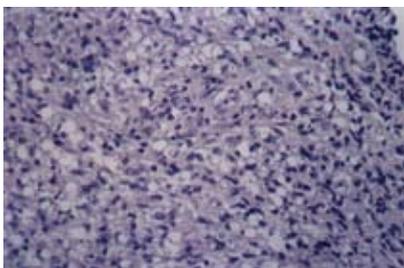


Figura 3. Necrose moderada e difusa associada ao infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, eosinofílico intenso e difuso na pata de um camundongo infectado por *L. (L.) amazonensis* 20 dias após a inoculação. HE, obj. 40x.

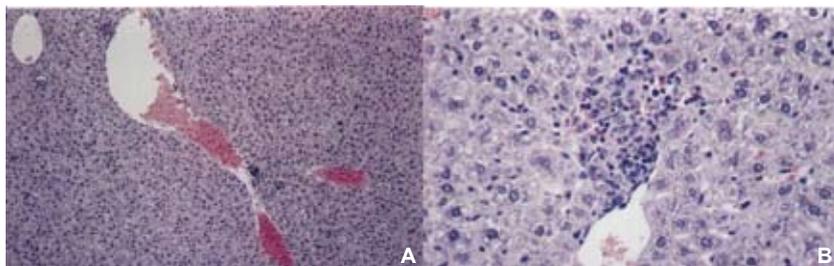


Figura 4. Fígado de camundongo infectado por *L. (L.) amazonensis* 60 dias após a inoculação do parasito. A – Infiltrados inflamatórios perivascularres discretos. Aumento de 100x. B – Com maior aumento, visualiza-se a natureza mononuclear do infiltrado inflamatório e a presença de eosinófilos. HE, obj. 40x.

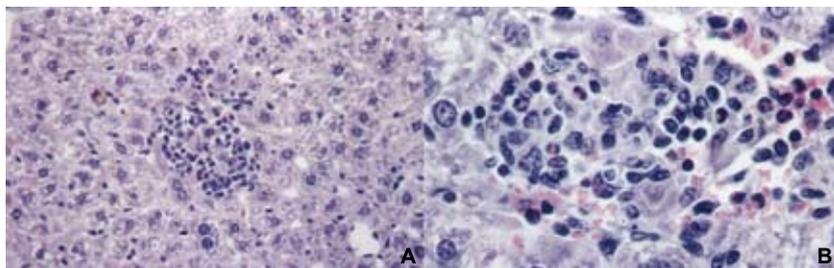


Figura 5. Fígado dos animais infectados por *L. (L.) amazonensis* 60 dias após a inoculação do parasito. A – Infiltrado inflamatório focal discreto. Aumento de 400x. B – Com maior aumento, visualiza-se a natureza mononuclear do infiltrado focal e a presença de eosinófilos. HE, obj. 100x.

DISCUSSÃO

Torna-se cada vez mais evidente que o complexo clinicopatológico das leishmanioses é um protótipo de doenças infecciosas crônicas, em que a reação imunológica mediada por células é predominante e de fundamental importância para a imunidade do hospedeiro à infecção ou à reinfecção (Garnham & Humphrey, 1969, Bryceson, 1970, 1976, Bryceson et al., 1970, Turk & Bryceson, 1971, Dumonde, 1973, Behin et al., 1977). A leishmaniose cutânea murina tornou-se um modelo para o estudo do desenvolvimento e controle das respostas imunológicas mediadas por células (Pearson & Wilson, 1988, Wilson & Pearson, 1990). A susceptibilidade à *Leishmania* é geneticamente determinada entre as diferentes linhagens de camundongos; porém, tanto em linhagens murinas sensíveis quanto nas resistentes ocorre o recrutamento de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos e mastócitos após a infecção experimental (Andrade et al., 1984, Pearson et al., 1987, Bogdan & Rollinghoff, 1999, Venuprasad et al., 2002).

No presente estudo, o intenso parasitismo e o infiltrado inflamatório encontrados apenas 20 dias após a inoculação da amostra de *L. (L.) amazonensis*, isolada inicialmente do gato, demonstram sua alta e rápida infectividade. É importante salientar que não foram detectadas, no gato de origem, doenças com características imunossupressoras, como as causadas pelo Vírus da Imunodeficiência Felina e pelo Vírus da Leucemia Felina (Souza et al., 2009).

Abreu-Silva et al. (2004a) verificaram, 20 dias após a infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c, um infiltrado inflamatório discreto, composto por eosinófilos, linfócitos e raros macrófagos parasitados. Decorridos 90 dias da infecção, a derme apresentava áreas de tecido necrosado, grande número de células mononucleares e macrófagos vacuolizados contendo amastigotas.

Neste trabalho, não foram encontrados sinais de visceralização, uma vez que não foram observados parasitos no fígado e no baço dos animais. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Cardozo (2004), que verificou ausência de parasitos, porém reação inflamatória focal e perivascular da mesma natureza em camundongos infectados experimentalmente com *L. (L.) amazonensis* 90 dias após a inoculação. Abreu-Silva et al. (2004a) verificaram a presença de um infiltrado inflamatório multifocal discreto em fígados de camundongos BALB/c 90 dias após a infecção por *L. (L.) amazonensis*.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval e à Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva, pela revisão científica do manuscrito.

ABSTRACT

Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a cat (*Felis catus*) from Mato Grosso do Sul State, Brazil

Even though the main mammalian reservoirs of *Leishmania* described in the Americas are rodents, opossums, horses, canines, and primates, the role of the cat as a host of *Leishmania* has also been discussed. This work was performed in order to study the histopathology of cutaneous lesions of mice infected with *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a cat in Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul, Brazil. The histopathological analysis comprised an assessment of the intensity and composition of the inflammatory infiltrate, as well as parasite load. Mice exhibited a high degree of cutaneous parasitism in the paw, at 20 days post infection, demonstrating the high and rapid infectivity of the sample isolated from the cat. An intense and diffuse lymphohistiocytic, eosinophilic inflammatory infiltrate and a diffuse, moderate necrosis were observed at the site of infection. It is important to note that the original cat presented no sign of immunosuppressive disease. The occurrence of visceralization was not observed, since no parasites were found in the liver or spleen 60 days after infection. Nonetheless, the liver presented focal and perivascular inflammatory reactions.

KEY WORDS: *Leishmania amazonensis*. Cat. Murine model. Histopathology.

REFERÊNCIAS

1. Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SM, Cardoso FO, Souza CS, Gonçalves da Costa SC. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121: 179-187, 2004.
2. Andrade ZA, Reed SG, Roters SB, Sadigursky M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 114: 137-148, 1984.
3. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, De Jesus AM, Almeida R, Badaró R, Barral-Neto M, Carvalho EM, Johnson Jr W. *Leishmania* in Bahia: evidence that *L. amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546, 1991.
4. Basano AS, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol* 7: 328-337, 2007.
5. Behin R, Mauel J, Rowe DS. Mechanisms of protective immunity in experimental cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. III. Inhibition of leishmanial lesion in the guinea-pig by delayed hypersensitivity reaction to unrelated antigens. *Clin Exp Immunol* 29: 320-325, 1977.
6. Bogdan C, Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today* 15: 22-28, 1999.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 183 p. il. (Série A: Normas e Manuais Técnicos)
8. Brumpt E. *Precis de Parasitologie*. 5 ed. Paris: Masson, 1936. p. 10244.
9. Bryceson AD, Bray RS, Wolstencroft RA, Dumonde DC. Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. *Clin Exp Immunol* 7: 301-341, 1970.

10. Bryceson AD. Cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol* 94: 23-226, 1976.
11. Cardozo C. Indução de resistência à infecção por *Leishmania amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) no modelo murino por formas atenuadas do parasito. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, 2004.
12. Dumonde DC. Immunological theory in leishmaniasis. *Ethiop Med J* 11: 199, 1973.
13. Garnham PCC, Humphrey JH. Problems in leishmaniasis related to immunology. *Curr. Top Microbiol Immunol* 48: 29-42, 1969.
14. Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Med Trop* 36: 71-80, 2003.
15. Grevot A, Jaussaud HP, Marty P, Pralong F, Ozon C, Haas P, Breton C, Bourdoiseau G. Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite* 13: 271-275, 2005.
16. Mancianti F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia* 46: 203-206, 2004.
17. Marzochi MCA, Marzochi KFB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Publ* 10: 359-375, 1994.
18. Mello GB. Verificação da infecção natural do gato (*Felis domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. *Brasil Médico* 54: 180, 1940.
19. Passos VMA, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 19-20, 1996.
20. Pearson RD, Uydess IL, Chapman SW, Steigbigel RT. Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *Ann Trop Med Parasitol* 81: 735-739, 1987.
21. Pearson RD, Wilson ME. Host defenses against prototypical intracellular protozoans, the *Leishmania*. In: Walzer PD, Genta RM (Eds). *Parasite infections in the compromised host. Immunological mechanisms and clinical applications*. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 31-81.
22. Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira FA, Madeira MF, Santos IB, Andrade MV, Cuzzi T, Marzochi MC, Schubach A. Leishmaniose tegumentar americana em gato doméstico (*Felis catus*) naturalmente infectado no Rio de Janeiro. Relato de isolamento de *Leishmania* sp. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 342, 2003.
23. Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira SA, Madeira MF, Santos IB, Andrade MV, Cuzzi T, Marzochi MCA, Schubach A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 165-167, 2004.
24. Shaw JJ, Ishikawa EAY, Lainson R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 783-784, 1989.
25. Simões-Matos L, Mattos MRF, Teixeira MJ, Oliveira-Lima JW, Bevilacqua CML, Prata-Junior RC, Holanda CM, Rondon FCM, Bastos KMS, Coelho ZCB, Coelho ICB, Pompeu MML. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet Parasitol* 127: 199-208, 2005.
26. Souza AI, Barros EMS, Ishikawa EAI, Ilha IMN, Marin GRB, Nunes VLB. Feline leishmaniasis due to *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol* 128: 41-45, 2005.
27. Souza AI, Nunes VLB, Borralho VM, Ishikawa EAI. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil: a case report. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 15: 359-365, 2009.
28. Turk JL, Bryceson AD. Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv Immunol* 13: 209-266, 1971.
29. Venuprasad K, Banerjee PP, Chattopadhyay S, Sharma S, Pal S, Parab PB, Mitra D, Saha B. Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN-gamma secretion and restriction of *Leishmania* growth. *J Immunol* 169: 920-928, 2002.
30. Wilson ME, Pearson RD. Immunology of leishmaniasis. In: Wyler DJ (Ed). *Modern parasite biology: cellular, immunological aspects*. New York: WH Freeman, 1990. p. 200-221.