



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA  
SÃO LUÍS – MARANHÃO

**ZULMIRA DA SILVA BATISTA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÃES PORTADORES DE  
LEISHMANIOSE TRATADOS COM EXTRATO SECO DE NONI  
(*Morinda citrifolia*)**

São Luís - MA

2014

**ZULMIRA DA SILVA BATISTA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÃES PORTADORES DE  
LEISHMANIOSE TRATADOS COM EXTRATO SECO DE NONI  
(*Morinda citrifolia*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Orientadora:** Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

**Área de Concentração:** Biotecnologia em Agropecuária

São Luís - MA

2014

..

## FICHA CATALOGRÁFICA

Batista, Zulmira da Silva

Avaliação da resposta imunológica de cães portadores de leishmaniose tratados com extrato seco de noni (*Morinda citrifolia*) / Zulmira da Silva Batista. – São Luís, MA, 2014.

Orientadora: Ana Lúcia Abreu Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Maranhão, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO.

1. Cães. 2. Citocinas 3. Leishmaniose visceral canina 4. *Morinda citrifolia*. I. Título

CDU 616.993.16

**ZULMIRA DA SILVA BATISTA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CÃES PORTADORES DE  
LEISHMANIOSE TRATADOS COM EXTRATO SECO DE NONI  
(*Morinda citrifolia*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação  
em Biotecnologia, como requisito para a obtenção do  
título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva (Orientadora)  
Rede Nordeste de Biotecnologia – Ponto Focal UEMA

---

Dra. Flavia de Oliveira Cardoso  
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

---

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento  
Rede Nordeste de Biotecnologia – Ponto Focal UFMA

---

Profa. Dra. Ana Clara Gomes dos Santos  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

---

Profa. Dra. Maria do Socorro Costa Oliveira Braga  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me ajudar a suportar todas as provas que surgiram ao longo dessa caminhada.

À minha família pelo apoio constante em todos os momentos de minha vida.

À minha orientadora Ana Lúcia Abreu Silva pelo exemplo de simplicidade, humildade e respeito ao próximo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia RENORBIO, na pessoa de sua atual coordenadora, Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra.

Ao laboratório Cernitas, por compreender e facilitar a minha ausência quantas vezes se fez necessário, representado por Daniel Chaves e Juceline Oliveira.

As minhas amigas de trabalho Analy Castro e Erlin Celi pelo apoio incondicional, em especial a Analy Castro.

Ao Prof. Felipe, por prontamente abrir as portas da Farmácia de Manipulação Alquimia todas as vezes que se fez necessário.

Ao diretor da distribuidora DISPET, representado por Fernando Soares Alencar.

As amigas Joicy, Nancyleni, Mylena e Alessandra, amizade que nasceu ao longo dos quatro anos de doutorado, o meu muito obrigada pela ajuda em todos os momentos de angústia.

A toda a equipe dos Laboratórios de Anatomopatologia e Biologia Molecular pela realização dos exames e apoio.

Aos profissionais, alunos e técnicos do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia da FIOCRUZ/RJ pela colaboração e parceria.

A minha família postiza, em especial a Carlizeth Melo, pelo suporte psicológico e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, FAPEMA, pela bolsa concedida.

Aos profissionais e alunos do LIF/UFMA pela colaboração e apoio técnico,

A todos as pessoas que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

*“Jamais considere seus estudos uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antroponose de distribuição mundial, que acomete o homem, canídeos e marsupiais. A doença é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e é transmitida pela picada de insetos flebotômíneos. O cão vem sendo apontado como principal hospedeiro e reservatório da LV, sendo provavelmente o mais importante reservatório natural relacionado aos casos humanos. Além disso, tem um papel fundamental na expansão da doença em áreas endêmicas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de citocinas, hematológico e bioquímico de cães portadores de *Leishmania infantum* e tratados com extrato seco de *Morinda citrifolia*. Para este estudo foram utilizados nove cães, de ambos os sexos e raças variadas. A triagem dos animais deu-se através do teste de ELISA/S7® e pesquisa do parasito em esfregaços sanguíneos. Os animais utilizados na pesquisas eram todos sintomáticos. Para realização da pesquisa foram colhidos sangue com EDTA para realização do hemograma e sangue sem EDTA para realização das dosagens bioquímicas e de citocinas. Foi colhido fragmento da pele da orelha para realização de exames histopatológicos e imunohistoquímicos. Foram avaliadas as seguintes variáveis clínicas: hipertrofia de linfonodos poplíteos, alterações cutâneas, onicogribose, caquexia e lesões oculares. Quanto aos sinais clínicos observou-se que 78% apresentavam linfadenopatia, 67% apresentavam alterações cutâneas; 55% apresentavam hepatoesplenomegalia, 44 % apresentavam estado de emagrecimento 33% presença de lesões oculares. Ao se verificar os valores hematológicos houve significado estatístico ( $p \leq 0,05$ ) nos valores do VGM e contagem de plaquetas. Para a avaliação das provas bioquímicas houve significado estatístico ( $p \leq 0,05$ ) para a dosagem de ALT, AST, ureia e creatinina. Em relação a dosagem de citocinas não houve resultado estatístico significativo. O exame histopatológico demonstrou diminuição do processo inflamatório. E o exame de imunohistoquímica não demonstrou presença do parasito. Dessa maneira, verificou-se que os estudos das diferenças no perfil de citocinas em cães que apresentavam as mais diversas formas de sintomas da LVC são inconclusivos, visto que os resultados encontrados são contraditórios.

**Palavras-chave:** Cães. Citocinas. Leishmaniose visceral canina. *Morinda citrifolia*

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a anthropozoonosis worldwide distribution that affects humans, canines and marsupials. The disease is caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania* and is transmitted by the bite of sand flies insects. The dog has been appointed as the main host and reservoir of LV, being probably the most important natural reservoir related to human cases. Moreover, it has a key role in the expansion of the disease in endemic areas. This study aimed to evaluate the cytokine profile, hematological and biochemical dogs with *Leishmania infantum* and treated with dry extract of *Morinda citrifolia*. For this study, nine dogs of both sexes and various breeds were used. Screening of animals was given through the ELISA / S7® testing and detection of parasites in blood smears. Animals used in the studies were all symptoms. To conduct the survey EDTA blood for complete blood count and blood without EDTA to carry out the biochemical and cytokines were collected. Tissue was also harvested in ear for conducting histopathological and immunohistochemical examinations. The following clinical variables was evaluated: hypertrophy of popliteal lymph nodes, skin changes, onychogryphosis, cachexia and eye injuries. Regarding clinical signs was observed that 78% had lymphadenopathy, 67% had skin lesions; 55% had hepatosplenomegaly, 44% had been slimming 33% presence of ocular lesions. While determining the hematologic values was statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) in the values of MCV and platelet count. For the evaluation of the biochemical significance was ( $p = 0.05$ ) for serum ALT, AST, urea and creatinine. Regarding cytokine assay no significant statistical result. The histopathological examination demonstrated decreased inflammation. And the examination of immunohistochemical not demosntrated presence of the parasite. Thus, it appears that studies of the differences in the cytokine profile in dogs presenting the most diverse forms of symptoms of CVL are inconclusive, since the results are contradictory.

**Keywords:** Dogs. Cytokines. Canine Visceral Leishmaniasis. *Morinda citrifolia*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Alterações dermatológicas e oftálmicas em cães portadores de *L. infantum*: (A) úlceras cutâneas (B) alopecia focal em pina de orelha, (C) alopecia, descamação furfurácea e onicogribose (D) secreção ocular mucoide. Fonte: Arquivo pessoal. 39
- Figura 02** – Animais portadores de *L. infantum*, tratados com noni, apresentando melhoria das alterações dermatológicas. Fonte: Arquivo pessoal 40
- Figura 03** – Mucosas normocoradas em cães portadores de *L. infantum*. Fonte: Arquivo pessoal. 42
- Figura 04** - Pele de cão infectado por *L. infantum* e tratamento com *Morinda citrifolia*: (A) seção histológica mostra discreta reação inflamatória e ausência de parasitos; (B) grave reação inflamatória; (C) imunohistoquímica mostrando mancha de infecção 150 dias após o tratamento. Fonte: Arquivo pessoal. 44

## LISTA DE TABELAS

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>Tabela 01</b> - | Valores hematológicos de referência do hemograma para cães.  | 34 |
| <b>Tabela 02</b> - | Valores bioquímicos de referência do hemograma para cães.  | 34 |
| <b>Tabela 03</b> - | Ocorrência dos sinais clínicos de cães portadores de <i>Leishmania infantum</i> .  | 38 |
| <b>Tabela 04</b> - | Valores médios e respectivos desvios-padrão das variáveis citocinas de animais infectados por <i>L. infantum</i> e tratados com extrato seco de <i>M. citrifolia</i> . | 45 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ L - microlitro

a.C. - antes de Cristo

ALT - aminotransferase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCs - células apresentadoras de antígenos

AST - aspartato transaminase

CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EDTA - ácido etilenodiamino tetracético

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GGT – gama glutamil transferase

HIV - vírus da imunodeficiência humana

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IgG - imunoglobulina G

IL-10 - interleucina 10

IL-12 - interleucina 12

IL-2 - interleucina 2

IL-4 - interleucina 4

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

LVH - Leishmaniose visceral humana

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg - miligrama

mL - mililitro

MS - Ministério da Saúde

NK - Natural Killer

NO - óxido nítrico

PBMC - Peripheral blood mononuclear cells

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA - ácido ribonucléico

ROIs - reativos intermediários de oxigênio

TGF- $\beta$  - fator de crescimento transformante beta

Th1 - T helper 1

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

VGM – volume globular médio

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO  | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA   | 18 |
| 2.1 Ciclo Biológico   | 18 |
| 2.2 Patogenia   | 18 |
| 2.3 Imunologia das Leishmanioses  | 19 |
| 2.4 Sinais clínicos   | 22 |
| 2.5 Diagnóstico   | 23 |
| 2.6 Controle e Tratamento da LVC  | 25 |
| 2.7 Fitoterápicos   | 26 |
| 2.7.1 <i>Morinda citrifolia</i>   | 27 |
| 3 OBJETIVOS   | 30 |
| 3.1 Objetivo Geral  | 30 |
| 3.2 Objetivos Específicos   | 30 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS  | 31 |
| 4.1 Animais   | 31 |
| 4.2 Acompanhamento dos animais  | 31 |
| 4.3 Coleta e preparação de material para análise.                         | 32 |
| 4.3.1 Sangue e soro   | 32 |
| 4.3.2. Medula óssea   | 32 |
| 4.4. Exame sorológico   | 32 |
| 4.4.1. ELISA (Ensaio Imunoenzimático “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) | 32 |

|  |    |
|--|----|
| 4.5. Exame parasitológico  | 33 |
| 4.5.1. Esfregaço por extensão  | 33 |
| 4.6. Análises laboratoriais  | 33 |
| 4.6.1. Hemograma e análises bioquímicas  | 33 |
| 4.7 Histopatologia e Imunohistoquímica   | 34 |
| 4.8 Coleta e Preparação do Extrato Bruto Seco de Noni ( <i>Morinda citrifolia</i> ). | 35 |
| 4.9. Ensaio terapêutico com o extrato bruto noni ( <i>Morinda citrifolia</i> )       | 35 |
| 4.10. Detecção de citocinas pelo método de ELISA                                     | 35 |
| 4.11 Análise estatística   | 36 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO   | 37 |
| 6 CONCLUSÃO  | 49 |
| REFERÊNCIAS  | 50 |
| APÊNDICE 1   | 60 |
| APÊNDICE 2   | 62 |
| ANEXO 1  | 63 |
| ANEXO 2  | 64 |
| ANEXO 3  | 65 |