

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 NA PELE
DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Ana Paula Prudente Jacintho
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Junho de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 NA PELE
DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Ana Paula Prudente Jacintho

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Co-orientadora: Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Área de Patologia Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Junho de 2012

J12a Jacintho, Ana Paula Prudente
Análise da expressão de MMP-2 e MMP-9 na pele de
cães com Leishmaniose Visceral /Ana Paula Prudente
Jacintho. – – Jaboticabal,
x, 67 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
2012

Orientador: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos
Banca examinadora: Rosangela Zacarias Machado,
Daniel Beretta
Bibliografia

1. Gelatinase A e B. 2. Imuno-histoquímica. 3.
Leishmania chagasi. 4. Pele. 5. Cão 6. Zimografia. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:616.993.161:636.7

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA PAULA PRUDENTE JACINTHO – nascida no dia 23 de fevereiro de 1985, natural de Santa Vitória, estado de Minas Gerais. Iniciou sua graduação no curso de Medicina Veterinária na Universidade de Franca, no ano de 2003 e concluiu a graduação em dezembro de 2007. Durante a graduação, participou de vários estágios relacionados com a área de Patologia Veterinária, onde realizou necropsia de animais domésticos e participou das aulas. No período de 2008 a 2010 foi residente do Programa de Aprimoramento Profissional da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Neste período, participou e publicou artigos científicos em anais de congressos, realizou estágio em Patologia Veterinária na UFLA – Universidade Federal de Lavras, em Lavras-MG, sob orientação da Profa. Dra. Mary Suzan Varaschin. Da mesma forma, em Patologia de Aves (California Animal Health & Food Safety Laboratory System - CAHFS), em Fresno- Califórnia- EUA, vinculado com a University of California- Davis (UCDavis), sob orientação do Prof. Dr. H.L. Shivaprasad. Em março de 2010 iniciou o curso de Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na mesma instituição, também sob a orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos e co-orientação da Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado (FMVA-UNESP, Campus de Araçatuba, SP).

O dia mais belo: hoje
A coisa mais fácil: errar
O maior obstáculo: o medo
O maior erro: o abandono
A raiz de todos os males: o egoísmo
A distração mais bela: o trabalho
A pior derrota: o desânimo
Os melhores professores: as crianças
A primeira necessidade: comunicar-se
O que traz felicidade: ser útil aos demais
O pior defeito: o mau humor
A pessoa mais perigosa: a mentirosa
O pior sentimento: o rancor
O presente mais belo: o perdão
o mais imprescindível: o lar
A rota mais rápida: o caminho certo
A sensação mais agradável: a paz interior
A maior proteção efetiva: o sorriso
O maior remédio: o otimismo
A maior satisfação: o dever cumprido
A força mais potente do mundo: a fé
As pessoas mais necessárias: os pais
A mais bela de todas as coisas: O AMOR!!!

Madre Tereza de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela paz e força espiritual para a realização desse trabalho. Pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter conhecido pessoas e lugares interessantes, mas também por ter vivido fases difíceis, que foram essenciais para meu amadurecimento.

À minha família, pelo apoio e amor incondicional.

À minha orientadora Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, por seus ensinamentos, paciência e confiança neste período que estive na UNESP-FCAV.

À Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado e ao Pós-graduando Guilherme Dias de Melo, pela disponibilização da sala de necropsia, do laboratório e pelos ensinamentos sobre a técnica de zimografia.

A todos os professores do Departamento de Patologia Veterinária da UNESP-FCAV, especialmente ao Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi e ao Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, pela atenção, carinho e ensinamentos sobre Patologia Veterinária nestes 2 anos de residência e 2 anos de mestrado.

A todos orientados da Profa. Rose, que ajudaram e foram essenciais no desenvolvimento e conclusão deste projeto.

À técnica Francisca de Assis Ardison pelo excelente trabalho nas confecções das lâminas.

À Fernanda, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos pelo carinho, companheirismo, pelas alegrias e momentos de descontração.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que ajudaram e contribuíram de alguma forma neste projeto!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Envolvimento cutâneo na LV canina.....	3
2.2 Metaloproteinases da matriz.....	5
3. OBJETIVOS.....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Animais.....	10
4.2 Análise em microscopia de luz.....	10
4.3 Análise da composição das fibras colágenas da derme.....	11
4.4 Análise imuno-histoquímica.....	11
4.4.1 Determinação da carga parasitária.....	11
4.4.2 Imunodeteção das MMPs 2 e 9 e das citocinas TGF- β e TNF- α	12
4.5 Análise da expressão das MMP-2 e MMP-9 por meio de zimografia.....	14
4.5 Análise estatística.....	15
5. RESULTADOS.....	17
5.1 Análise histopatológica.....	17
5.2 Análise imuno-histoquímica.....	30
5.3 Zimografia.....	36
6. DISCUSSÕES.....	40
7. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	19
Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Focinho com inflamação multifocal (*) ao redor de anexos. (B) Orelha com inflamação difusa. Detalhe do infiltrado rico em macrófagos e plasmócitos. (C) Abdômen com foco granulomatoso na derme superficial (*). Hematoxilina Eosina. Obj. 40x.....	
Figura 2	20
Gráfico de distribuição do infiltrado inflamatório na pele de cães com Leishmaniose Visceral. Observar no grupo oligossintomático animais sem inflamação na pele das regiões do focinho (A), orelha (B) e abdômen (C). Letras diferentes são significativas pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P < 0,05$).....	
Figura 3	21
Gráfico de distribuição do infiltrado inflamatório na pele de cães com Leishmaniose Visceral. Observar nos grupos assintomático e sintomático a distribuição da inflamação cutânea das regiões do focinho (A), orelha (B) e abdômen (C). Letras diferentes são significativas pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P < 0,05$).....	
Figura 4	23
Gráfico de perfil celular predominate na inflamação cutânea em cães com Leishmaniose Visceral. Grupo sintomático predominância de macrófagos (M), nas regiões do focinho (A), orelha(B) e abdômen (C). Letras diferentes são significativas pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P < 0,05$). P= plasmócitos; L= linfócitos....	
Figura 5	25
Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Abdomên com mastócitos associados às células inflamatórias presentes no infiltrado cutâneo, em derme superficial (seta). (B) Focinho com infiltrado de mastócitos ao redor de anexos. Azul de Toluidina. Obj. 40x.....	
Figura 6	26
Gráfico de média e erro-padrão da densidade de células parasitadas na pele de cães dos grupos assintomático (A), oligossintomático (O) e sintomático (S) para Leishmaniose Visceral. Médias indicadas por letras minúsculas distintas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn.....	

Figura 7	Gráfico da densidade de mastócitos de cães dos grupos assintomático, oligossintomático e sintomático para Leishmaniose Visceral, na pele das regiões do focinho (A), orelha (B) e abdômen (C). Letras diferentes são significativas pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P<0,05$).....	27
Figura 8	Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Focinho com inflamação multifocal (Hematoxilina e Eosina) ao redor de anexos cutâneos (setas), com intensa degradação do colágeno (B/C Picrus Sirius Red). Obj. 40x.....	29
Figura 9	Gráfico da média e erro-padrão da densidade de células parasitadas na pele de cães dos grupos assintomático (A), oligossintomático (O) e sintomático (S) para Leishmaniose Visceral. Médias indicadas por letras minúsculas distintas diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn.....	30
Figura 10	Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A/C) Focinho e abdômen com inflamação granulomatosa rica em parasitas (Hematoxilina e Eosina). (B/D) Mesmas regiões com imunomarcação para <i>Leishmania chagasi</i> (Imuno-histoquímica). Obj. 40x....	31
Figura 11	Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Região de orelha apresentando imunomarcação para MMP-2 em inflamação granulomatosa em derme superficial. (B) Região de focinho com imunomarcação ao redor de anexos cutâneos e epitélio (Complexo de polímeros ligados a peroxidase). A / Obj. 10x e B / Obj. 20x.....	33
Figura 12	Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. Região de focinho apresentando imunomarcação para MMP-9 em inflamação granulomatosa ao redor de anexos cutâneos (Complexo de polímeros ligados a peroxidase). Obj. 40x.....	34
Figura 13	Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. Região de focinho apresentando imunomarcação para TGF- β em inflamação granulomatosa ao redor de anexos cutâneos. (Complexo secundário de amplificação por polímeros livres de biotina). Obj. 40x.....	35

- Figura 14 Zimograma representativa da pele de cães com Leishmaniose Visceral apresentando bandas gelatinolíticas correspondendo a pro-MMP-9 (92 kDa), MMP-9 ativa (86 kDa), pro-MMP-2 (72 kDa) e MMP-2 ativa (66 kDa). (A) Peso molecular (adenocarcinoma de glândula mamária usado como controle positivo). (B) Cães infectados sintomáticos. (C) Cães não infectados (grupo controle)..... 36
- Figura 15 Gráfico da atividade gelatinolítica da pele de cães com Leishmaniose Visceral. Pele total (regiões Focinho + Orelha + Abdômen). Teste de Mann Whitney- MMP-9 latente ($P=0,1166$); MMP-9 ativa ($P=0,0122^*$); MMP-2 latente ($P=0,7147$); MMP-2 ativa ($P=0,1762$)..... 37
- Figura 16 Gráfico da atividade gelatinolítica da pele de cães com Leishmaniose Visceral. (A) Pele região A (focinho). MMP-9 latente ($P=0,0106^*$); MMP-9 ativa ($P=0,0115^*$); MMP-2 ativa ($P=0,0249^*$). (B) Pele região B (orelha) MMP-9 latente ($P=0,0409^*$); MMP-9 ativa ($P=0,0067^*$); MMP-2 ativa ($P=0,0384^*$). (C) Pele região C (abdômen). Teste de Mann Whitney..... 38
- Figura 17 Gráfico da atividade gelatinolítica da pele de cães com Leishmaniose Visceral. Grupos assintomático, oligossintomático, sintomático e controle. Teste de Comparação Múltipla de Dunn. MMP-9 ativa ($P=0,0151^*$).. 39

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas na pele de cães com LV	14
Tabela 2 Tipo de recuperação antigênica e tempo para cada anticorpo primário.....	14

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 NA PELE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – Os cães infectados pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* podem ou não apresentar sinais clínicos dessa zoonose e são a principal fonte de infecção para o homem. A pele é o primeiro órgão infectado pelo parasito na LVC. As enzimas metaloproteinases da matriz (MMPs) atuam na degradação da matriz extracelular (MEC) e na modulação da resposta inflamatória, frente a vários tipos de injúrias. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de MMP-2 e MMP-9, por meio da técnica de imuno-histoquímica e zimografia na pele de cães naturalmente acometidos por LVC e comparar estes resultados com a imunodeteção das citocinas TNF- α e TGF- β e do protozoário *Leishmania*, com as possíveis alterações da matriz extracelular dermal. A alteração da composição de fibras colágenas da derme foi avaliada pela coloração PicroSirius. O método foi usado para diferenciar fibras colágenas dos tipos I e III, nas regiões do focinho, orelha e abdômen. A carga parasitária, intensidade de inflamação e a produção de MMP 2 e 9 foram maiores nas regiões cutâneas da orelha e focinho. Os macrófagos, linfócitos e plasmócitos predominaram no infiltrado inflamatório da derme superficial, formando granulomas, associados a degradação do colágeno maduro (tipo I) e a discreta deposição de colágeno jovem (tipo III), com maior intensidade nos cães com elevada carga parasitária cutânea. O TGF- β foi detectado nos três grupos de cães infectados (assintomático, oligossintomático e sintomático), sem diferenças significativas entre eles. O TNF- α não foi detectado na maioria dos animais infectados e no grupo controle. Conclui-se que quanto maior a carga parasitária e a intensidade de inflamação na pele, maior a degradação do colágeno maduro, produção de MMPs 2 e 9 e produção de TGF- β . A MMP-9 ativa poderia ser utilizada como marcador de inflamação em animais infectados. Este perfil de resposta do hospedeiro possivelmente favorece a disseminação sistêmica do parasito.

Palavras-chave: gelatinases A e B, Imuno-histoquímica, *Leishmania chagasi*, pele, cão, zimografia.

EXPRESSION OF MMP-2 AND 9 IN SKIN OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS.

SUMMARY - Dogs infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* may or may not show clinical signs of the zoonosis and they are the main source of infection for man. The skin is the first organ infected by the parasite in the LVC. The enzyme matrix metalloproteinases (MMPs) act on the degradation of extracellular matrix (ECM) and in the inflammatory response modulation against many kinds of injuries. The aim of this study was to evaluate the expression of MMP-2 and MMP-9 by immuno-histochemistry and zymography in the skin of dogs naturally affected by LVC and the immunodetection of TNF- α and TGF- β and of *Leishmania* and compare these results with the possible alterations of dermal extracellular matrix. The method was used to differentiate collagen fibers in the dermis was evaluated by Picrosirius red staining to differentiate collagen types I and III, in regions of the nose, ear and abdomen. The parasite load, intensity of inflammation, increased production of MMP 2 and 9 were higher in regions of the ear and muzzle. Macrophages, lymphocytes and plasma cells predominated in the inflammatory infiltrate of the superficial dermis, forming granulomas, associated with degradation of mature collagen (type I) and the discrete deposition of the young collagen (type III), with greater intensity in dogs with high parasite load skin. The TGF- β was detected in all groups of infected dogs (asymptomatic, oligosymptomatic and symptomatic), no significant differences among them. The TNF- α was not detected in most infected animals and the control group. It follows that the greater is the intensity of parasitic load and inflammation of the skin, the greater is the degradation of mature collagen, the production of MMPs and 2 and 9, production of TGF- β . Active MMP-9 could be used as a marker of inflammation in infected dogs. This profile of the host response possibly favors a systemic dissemination of the parasite.

Keywords: gelatinases A and B, Immunohistochemistry, *Leishmania chagasi*, skin, dog, zymography.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MMP-2 E MMP-9 NA PELE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

I. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, Febre Dum-Dum ou Leishmaniose Visceral Americana, é uma zoonose endêmica que tem ampla distribuição geográfica, predominando em regiões tropicais e subtropicais. A LV era considerada uma enfermidade restrita a áreas rurais ou de ambiente silvestre, mas hoje se sabe que ela pode ocorrer em zonas urbanas, com casos humanos e caninos notificados em 19 dos 27 estados do Brasil (BRASIL, 2006). Esta zoonose é causada por um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. O grupo que causa a LV é composto pelas Leishmanias do complexo *Leishmania donovani*, composto por *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo esta última a responsável pela doença no continente americano (CORREA, 1971, URQUIHART et al., 1998, MICHALICK, 2005).

No Brasil, o vetor dessa doença são insetos flebotomíneos que pertencem ao gênero *Lutzomyia*, dentre os quais *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi* (Mato Grosso do Sul) são os vetores de LV. Este mosquito possui hábitos peridomésticos e intradomiciliares e seu criadouro ideal é matéria orgânica úmida. Ele faz repasto sanguíneo em várias espécies de animais, portanto existem vários reservatórios domésticos e silvestres do protozoário *Leishmania*, tais como o cão, a raposa, outros canídeos, roedores (URQUIHART et al., 1998, MICHALICK, 2005) e o gambá (SANTIAGO et al., 2007). DANTAS–TORRES (2006) destaca que existem outras formas de transmissão da *Leishmania*, entre elas a que ocorre pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, ectoparasita que desenvolve seu ciclo em mais de um hospedeiro, favorecendo a transmissão do protozoário para o cão.

O protozoário *Leishmania (L.) chagasi* pode ser encontrado nas formas promastigota (formas flageladas), no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e, na forma amastigota (forma não flagelada), presente no citoplasma dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o mosquito-palha ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas. No intestino do inseto diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas. O mosquito infectado inocula estas formas infectantes na corrente sanguínea de um novo hospedeiro. Na epiderme do hospedeiro, as formas infectantes são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, com posterior disseminação hematogênica e linfática para outros órgãos (CORREA, 1971, URQUIHART et al., 1998, FORTES, 2004).

Os cães soropositivos para a LV se dividem em três grupos: cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Dependendo da imunocompetência do hospedeiro, os sinais clínicos tornam-se evidentes dentro de um período que varia de um mês a vários anos e a sua evolução pode ocasionar o óbito (BRASIL, 2006, ROSA et al., 1997, FEITOSA et al., 2000). A progressão desta zoonose é crônica e se caracteriza por febre (40°C), anorexia, anemia, edema, hemorragia intestinal e epistaxe (ROSA et al., 1997, FEITOSA et al., 2000, JONES et al., 2000, IKEDA-GARCIA et al., 2007). Lesões cutâneas como descamações, ulcerações com crostas na borda da orelha, focinho e dorso, linfonodos periféricos aumentados, onicogribose, úlceras na boca (gengivas e bochechas), opacidade das córneas e conjuntivite purulenta são os achados clínicos mais frequentes (ROSA et al., 1997, FEITOSA et al., 2000, JONES et al., 2000, BRASIL, 2006).

Os principais achados de necropsia são esplenomegalia, hepatomegalia e linfonodos tumefeitos (ROSA et al., 1997, JONES et al., 2000, FEITOSA et al., 2000).

A pele é o primeiro órgão infectado pelo protozoário *Leishmania* sp.. O entendimento da interação entre parasito e células da derme seria essencial para explicar a disseminação no organismo do cão. Comparar o perfil de células inflamatórias, das metaloproteinases (MMPs) 2 e 9, as alterações do colágeno e as citocinas TGF- β e TNF- α predominantes nos diferentes grupos clínicos (assintomático,

oligossintomático e sintomático) seria importante para a compreensão da complexa patogenia da LV na pele.

II- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENVOLVIMENTO CUTÂNEO NA LV CANINA

De acordo com o Ministério da Saúde (2006), a pele é o primeiro alvo do mosquito-palha na infecção por LV no cão e no homem. Em estudo realizado em Belo Horizonte, avaliou-se a pele íntegra (247 animais) e de lesões cutâneas (147 animais) de cães com LV. O protozoário *Leishmania* foi isolado de 78,7% dos cães estudados, sendo que, (151/247) 61,1% foi isolado dos animais com pele íntegra e (89/147) 60,5% do grupo de cães com lesões na pele. Esses resultados reforçam a hipótese de que os cães assintomáticos podem ser potenciais transmissores de *Leishmania* sp. (MADEIRA et al., 2009).

O aspecto microscópico mais comum da pele de cães com LV é a inflamação ao redor de folículos pilosos e de glândulas sebáceas, bem como ao redor de vasos da derme superficial. Descreve-se a predominância de macrófagos, seguidos de plasmócitos, linfócitos e raros neutrófilos neste infiltrado. As formas amastigotas do protozoário podem ser observadas dentro do citoplasma dos macrófagos, mais intensamente em cães sintomáticos (SOLANO-GALLEGO et al., 2004, REIS et al., 2009). Além da inflamação da derme descreve-se uma redução de colágeno tipo I e um aumento do colágeno tipo III, devido aos efeitos deletérios do processo inflamatório (GIUNCHETTI et al., 2006). Em estudos realizados em cães sintomáticos e assintomáticos, quando submetidos ao xenodiagnóstico, somente o grupo sintomático foi capaz de infectar o flebotomíneo. Mas a inflamação foi vista na derme de ambos os grupos, com predominância da pele da orelha e da região ungueal. A presença de protozoários na derme foi observada somente no grupo com sintomas de LV (VERÇOSA et al., 2008).

Os mastócitos são derivados da medula óssea e dependem do fator de crescimento derivado de células-tronco para sobreviver, caso contrário, ocorre apoptose. Após sua ativação, liberam imediatamente grânulos associados a mediadores que induzem inflamação. Esta ativação pode ser seguida por síntese de quimiocinas e citocinas, podendo contribuir para inflamação crônica (METCALFE et al., 1997). Além do infiltrado leucocitário já descrito, a infecção pela *Leishmania* do hospedeiro susceptível pode ser caracterizada por infiltrado de mastócitos no tecido infectado, seguido de aumento no número de parasitas. O papel dos mastócitos na leishmaniose ainda é incerto. Pelo fato de a *Leishmania donovani* se disseminar para órgãos linfóides, em oposição à infecção por *Leishmania major* que se encontra restrita a lesão cutânea e nos linfonodos regionais, portanto, os mastócitos podem apresentar funções distintas na LV e na Leishmaniose cutânea (SAHA, et al., 2004).

A resistência para LV está associada com a ativação de citocinas Th1 e com a produção de INF- γ , IL-2 e TNF- α . O principal mecanismo efetor é a ativação de macrófagos por INF- γ e TNF- α , para destruir amastigotas intracelulares, por meio da síntese de óxido nítrico (BARBIÉRI, 2006). O grau de severidade clínica e a evolução da doença estão relacionados ao equilíbrio das respostas imune celular (Th1) e humoral (Th2) do cão infectado (BRITO, 2006).

A epiderme possui células apresentadoras de antígenos (células de Langerhans) para a modulação da resposta imune. Já os queratinócitos expressam MHC-II. O equilíbrio entre os perfis de resposta Th1 e Th2, depende da habilidade destes dois tipos celulares em apresentar antígenos para linfócitos T, bem como, do microambiente de citocinas gerado no sítio de infecção. A carga parasitária por *Leishmania infantum* na pele foi mais elevada em cães com lesões nodulares difusas do que em animais com lesões cutâneas alopecicas. Nestas últimas foi maior o número de células apresentadoras de antígenos e de queratinócitos expressando MHC-II, que resultou numa maior migração de linfócitos para o sítio de infecção e consequentemente numa resposta cutânea mais adequada (FONDEVILA et al., 1997). As citocinas IFN- γ e IL-2 são importantes neste controle. Sabe-se que cães com severos sinais clínicos de LV e

com elevada carga parasitária na pele, geralmente apresentam uma expressão de citocinas predominantemente Th2 (REIS et al., 2009).

2.2 METALOPROTEINASES DA MATRIZ

A matriz extracelular é um complexo estrutural que cerca e apoia as células encontradas nos tecidos. Ela é composta principalmente por proteínas estruturais (colágeno e elastina), proteínas especializadas ou moléculas adesivas (fibronectina, laminina e fibrilina), proteínas da matriz e moléculas de superfícies de células. As MMPs são endopeptidases zinco-dependentes, capazes de degradar a matriz extracelular, assim como a membrana basal (CAWSTON & WILSON, 2006).

Existem cerca de trinta MMPs descritas (KUPAI et al., 2010). Estas são divididas em diferentes grupos de acordo com seus substratos, chamados estromelisinases, colagenases e gelatinases. Todas MMPs contêm zinco presente no centro catalítico e são todas produzidas em forma de pró-enzima. A latência da pró-MMP é mantida por um resíduo de cisteína conservada no pró-domínio com o zinco catalítico no centro ativo (CAWSTON & WILSON, 2006).

As MMPs são produzidas por vários tipos de células (fibroblastos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células sinoviais e algumas epiteliais). Elas regulam vários processos biológicos e conseqüentemente são precisamente controladas pela síntese, secreção, ativação de pró-enzimas e inibição de enzimas ativas. Sua atividade é regulada tanto positivamente como negativamente por citocinas e fatores de crescimento, como o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF (fator de crescimento derivado de fibroblastos), interleucinas (IL-1, IL-4 e IL-6), membros da família do fator transformador de crescimento (EGF, HGF e TGF- β) ou pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (KUMAR et al., 2005; CAWSTON & WILSON, 2006; SPINALE, 2007).

As MMPs podem ser ativadas por duas vias, pela ação proteolítica ou pela ação oxidativa / nitrosativa. Na ativação proteolítica da pro-MMP2 (72kDa) pelo MT-MMP/TIMP ou por outra protease ocorre a remoção do domínio do propeptídeo auto-

inibitório, que preserva a latência, resultando em uma MMP-2 ativada (62kDa). MMPs ativas são inibidas por inibidores endógenos, tais como TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases), que se ligam fortemente às MMPs ativas em uma proporção de 1:1, permitindo o controle da degradação do tecido, porém a inibição pode ocorrer também por macroglobulinas- α (NAGASE et al., 1999; KUPAI, 2010).

As MMPs são associadas a vários processos fisiológicos, como a morfogênese, angiogênese e reparação tecidual. A atividade irregular das MMPs atua em um grande número de processos patológicos agudos e crônicos, como no infarto do miocárdio agudo, falência cardíaca aguda, doença obstrutiva pulmonar aguda, artrite e outros processos inflamatórios. Possuem um papel importante na disseminação de células tumorais em neoplasias, participando na degradação da matriz extracelular. Estas enzimas são importantes também na regulação do crescimento de tumores primários e metastáticos, mantendo um microambiente favorável para que isto ocorra. As células neoplásicas podem induzir sua síntese em componentes da matriz extracelular (fibroblastos) e em macrófagos e produzir enzimas denominadas de gelatinases (MMP2 e MMP9), que degradam a membrana basal e fibras colágenas e permitem a migração de células de carcinomas até a parede dos vasos sanguíneos (NAGASE et al., 1999; GUTIERREZ et al., 2008; KUPAI, 2010).

A MMP-2 é conhecida como gelatinase A e a MMP-9 como gelatinase B, sendo que a MMP-2 é de expressão constitutiva, pouco responsiva à maioria de estímulos e a MMP-9 é induzível, sendo considerada um marcador da inflamação sistêmica em animais (OPDENAKKER et al., 2001).

O efeito modulador da resposta imune, induzido pelas MMPs, foi comprovado em cardiopatias descritas na Doença de Chagas. Estas duas enzimas foram importantes no agravamento das lesões cardíacas, pelo estímulo de uma resposta imune do tipo Th1, com aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF-alfa e IFN-gama). Essas citocinas levaram ao influxo de células inflamatórias no miocárdio e ao agravamento dos sintomas, por comprometimento da função cardíaca. Quando estas metaloproteinases foram inibidas, as lesões miocárdicas reduziram e houve uma melhor

perspectiva de sobrevivência do indivíduo na fase aguda da infecção (GUTIERREZ et al., 2008).

Na LV os estudos realizados descreveram alterações na matriz extracelular da pele, em camundongos infectados experimentalmente por *Leishmania amazonensis* (ABREU-SILVA et al., 2004), *L. donovani* (GOSH et al., 1999) e *L. mexicana* (LIRA et al., 1997). Nestes casos alterações na composição das fibras colágenas, caracterizadas por substituição do colágeno tipo I pelo tipo III (*L. amazonensis* e *L. donovani*) e ligação do protozoário às fibras colágenas do tipo I (*L. mexicana*) foram observados (LIRA et al., 1997, GOSH et al., 1999, ABREU-SILVA et al., 2004). Em estudos feitos em cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, descreve-se a mesma alteração na composição das fibras colágenas e também uma diminuição das proteínas fibronectina e laminina, que compõe a matriz extracelular, na pele dos cães sintomáticos e oligossintomáticos. Estas alterações poderiam favorecer a ligação do parasito aos macrófagos e talvez facilitar sua difusão para outros tecidos (MELO, 2005). Melo (2008) analisou outros tecidos de animais sintomáticos e observou que houve uma maior deposição de colágeno no fígado, baço e na região medular dos linfonodos cervicais, associada ao parasitismo tecidual e a processos degenerativos. Tanto o parasitismo tecidual quanto a inflamação dos tecidos estudados teve uma correlação com as alterações da matriz extracelular nos animais infectados.

Na LV canina existe um estudo que avaliou a expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9 no líquido de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* os autores sugeriram que a migração leucocitária seria facilitada por danos à barreira hematoencefálica (BHE) e hematoliquórica causados pelas mesmas, favorecendo a neuroinflamação. Essa observação deve-se à detecção de altos níveis de MMP-9 latente e ativada somente em cães infectados (MARANGONI et al., 2011). Essa associação também já foi feita entre MMPs e outros patógenos, tais como o vírus do Nilo Ocidental, que teria a sua entrada no cérebro facilitada pelo aumento da permeabilidade da BHE, devido à lesão causada por estas enzimas (WANG et al., 2008). No entanto, quando a presença destas enzimas foi detectada no tecido nervoso canino, não foram identificadas formas ativas das mesmas, mas sim concentrações

elevadas da forma latente de MMP-2 em cães oligossintomáticos, sugerindo um estado pró-inflamatório no encéfalo destes cães (MACHADO et al., 2010). Quando a análise foi feita no soro de cães com LV, Melo et al. (2011) observaram que na infecção natural pela *L. (L.) chagasi* houve ativação da forma latente de MMP-9.

A ação das MMPs nos tecidos injuriados por diferentes patógenos pode ser um mecanismo de evasão imune destes agentes etiológicos, para se difundirem para os diferentes órgãos-alvo. O primeiro local onde *L. (L.) chagasi* tem acesso ao hospedeiro é a pele. Sabe-se que para a sobrevivência do parasita é necessária sua interação com macrófagos, pelos quais são fagocitados e posteriormente mudam a sua morfologia para a forma amastigota. Como a *Leishmania* modula essa interação com as células do hospedeiro ainda não está completamente esclarecido. A matriz extracelular é um componente muito importante na interação do parasita com o endotélio vascular. Talvez as formas amastigotas de *Leishmania* presentes no citoplasma de macrófagos possam estimular a síntese de citocinas ou de enzimas líticas (gelatinases) que permitam a sua disseminação para outros tecidos ou a quimiotaxia de leucócitos para a pele, através da degradação desta matriz. A chegada de mais macrófagos na pele permitiria a invasão de novas células pelo parasito e a sua multiplicação dentro deles, para posterior disseminação sistêmica. Da mesma forma, sabe-se que fibroblastos são capazes de sintetizar gelatinases. No entanto, a patogenia desta interação do patógeno com a matriz extracelular ainda não está totalmente esclarecida, bem como o papel das MMPs na pele foi pouco estudado. Portanto, a avaliação da expressão das enzimas MMP-2 e MMP-9 no tecido cutâneo e a determinação de quais células as estariam produzindo e quantificá-las em suas isoformas ativa e inativa, permitiria compreender a sua importância na modulação da resposta imune cutânea. Isso foi possível pela análise conjunta da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e antiinflamatórias (TGF- β).

III- OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste estudo foram associar a inflamação cutânea com a presença de formas ativas das MMPs 2 e 9 e com as citocinas TNF- α e TGF- β em diferentes áreas anatômicas (focinho, orelha e abdômen) e estádios clínicos dos cães (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos) e verificar as alterações na derme associadas a elas.

Entre os objetivos específicos estão:

- Determinar o perfil de células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos, macrófagos e mastócitos) na pele do focinho, orelha e abdômen.
- Determinar a densidade de células parasitadas nas mesmas regiões, por meio de análise imuno-histoquímica;
- Determinar a composição de fibras colágenas nestas áreas, por meio da coloração de Picrus Sirius Red;
- Determinar a expressão de formas latentes (pro-MMPs) e ativas das MMPs-2 e 9, nas três áreas da pele, por meio de zimografia.
- Determinar o perfil predominante das citocinas TNF- α e TGF- β nas mesmas regiões da pele, por imuno-histoquímica;
- Associar a reação inflamatória, perfil de citocinas e MMPs, a carga parasitária e a composição do colágeno dermal, considerando o estadiamento clínico e a carga parasitária das diferentes regiões da pele.

IV- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os cães utilizados neste estudo foram oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, SP, onde foram submetidos à eutanásia, devido ao diagnóstico positivo para Leishmaniose Visceral. Foram utilizados 36 cães, sem predileção por idade, raça ou sexo. Os cães utilizados no presente estudo foram submetidos à eutanásia sob anestesia barbitúrica (Tiopental, Cristália Itapira, SP), seguido da injeção intravenosa de cloreto de potássio, conforme recomenda o código de ética para uso de animais em pesquisa científica (AVMA, 2001) e em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose visceral devam ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução nº. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

A necropsia foi realizada imediatamente após a morte. Neste momento os animais foram classificados nos grupos sintomático (S), oligossintomático (O) e assintomático (A) (BRASIL, 2006). Foram considerados sintomáticos os cães que apresentaram emagrecimento, lesões cutâneas, onicogribose e linfadenomegalia. Os assintomáticos não apresentaram nenhuma sintomatologia clínica evidente. Os oligossintomáticos apresentaram pelo menos um sinal clínico (ex. aumento de volume de linfonodos).

Um grupo controle foi composto por quatro cães provenientes de área não endêmica para LV (Jaboticabal - SP), procedentes da rotina de necropsias do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP.

O delineamento deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (protocolo CEUA nº. 020373/09) da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

4.2 ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE LUZ

Para as análises histológica e imuno-histoquímica foram colhidos fragmentos de aproximadamente 2x2cm da pele do focinho (região de transição entre o focinho e a pele), orelha (terço médio do pavilhão auricular) e do abdômen (região abdominal ventral glabra, próximo a linha alba), que são os locais de maior probabilidade de contato com o inseto vetor. Estas amostras foram analisadas, independente da presença de lesões cutâneas (úlceras, crostas, descamação) observadas no exame externo do cadáver. Colocaram-se os fragmentos de pele em cassetes histológicos e estes foram fixados em solução de formol 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,2), por 12 horas. Estes foram processados, incluídos em parafina, cortados em micrótomo na espessura de 5µm e corados por Hematoxilina e Eosina.

Avaliou-se a resposta inflamatória cutânea e a composição celular predominante (linfócitos, plasmócitos, macrófagos, mastócitos, etc.) em cães com evolução espontânea da doença, em microscopia de luz (microscópio Nikon E200). A intensidade da reação inflamatória e o tipo de célula predominante foram classificados por escores, indicando a intensidade e distribuição da inflamação em discreta (1), moderada (2), acentuada (3) e ausente (4).

Para a análise dos mastócitos utilizou-se a coloração histoquímica Azul de Toluidina nos cortes incluídos em parafina. O número total de mastócitos / área / animal foi considerado em cinco campos microscópicos (obj. 40x). A média de mastócitos por animal foi determinada pela somatória do número destas células nos campos, nos grupos (sintomático, assintomático e oligossintomático), nas três regiões coletadas, que foram denominadas de focinho (A), orelha (B) e abdômen (C).

4.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS DA DERME

Foi feita segundo Melo (2005), utilizando-se as amostras de pele incluídas em parafina e coradas por Sirius Red dissolvido em solução saturada de ácido Pícrico, que com o filtro de polarização, permitiu diferenciar as fibras colágenas tipo I (maduras) das do tipo III (neoformadas). Avaliou-se a proporção de cada tipo de fibra colágena por

animal e esses valores foram comparados nos três grupos clínicos deste estudo. Esta proporção foi determinada por escores: em discreta (1), moderada (2), acentuada (3).

4.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.4.1 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

Por meio da técnica de imuno-histoquímica foi avaliada a carga parasitária da pele. Realizou-se a desparafinização dos cortes em estufa a 60°C / 1 hora. Após as amostras foram imersas em concentrações decrescentes de xilol, hidratadas em álcool e posteriormente foram banhadas em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada no calor (banho-maria a 95°C/ 30 minutos), em solução de citrato de sódio 10 mM, pH 6,0. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com uma solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes (MERCK) e metanol a 97% (Labsynth), concentrada a 3% / 10 minutos. No bloqueio das reações inespecíficas utilizou-se produto comercial (Protein Block, DAKO, cód. X0909) /20 minutos. Entre cada um dos passos descritos fez-se banhos em água destilada seguidos de solução tampão de TRIS-HCl, pH7,4, por cinco minutos cada. Utilizou-se como anticorpo primário soro hiperimune de cão positivo para LV, conforme protocolo descrito por Tafuri et al. (2004), modificado por Moreira et. al. (2010), na diluição de 1:1000. Na revelação da reação realizou-se o Complexo Estreptavidina Peroxidase, de acordo com as instruções do fabricante (kit LSAB – DAKO, cód. K0690-1), utilizando-se o cromógeno 3,3-diaminobenzidina por 3 minutos (DAB, DAKO, cód. K3468-1). A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan (Merck).

4.4.2 IMUNODETECÇÃO DAS MMPS 2 E 9 E DAS CITOCINAS TGF- β E TNF- α

No procedimento para imunomarcação de MMP-2 e MMP-9 utilizou-se os anticorpos policlonais produzidos em coelho anti-MMP-2 (ab79781, Abcam) e anti-MMP-9 (ab38898, Abcam). A imunomarcação de TGF- β e TNF- α foi feita com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-TGF- β (SC-146, Santa Cruz Biotechnology) e

anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-TNF- α (SC-80386, Santa Cruz Biotechnology), com protocolo semelhante ao descrito para a carga parasitária.

No anticorpo MMP-9 utilizou-se a diluição de 1:4500, com incubação por 18 horas a 4°C, em câmara úmida. Para a recuperação antigênica utilizou-se o calor (banho-maria), com solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0, por 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi a 15%, por 30 minutos, após a incubação com o anticorpo primário. O complexo secundário utilizado foi o polímero ligado a peroxidase (Kit Advance, cód. K4068, DAKO) e a revelação foi realizada com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina por 3 minutos (DAB, DAKO, cód. K3468-1). O protocolo utilizado para o anticorpo anti-MMP-2 foi idêntico ao da MMP-9, porém com diluição do anticorpo primário de 1:250.

Para o anticorpo anti-TGF- β realizou-se uma diluição de 1:500. A incubação foi feita por 18 horas a 4°C, em câmara úmida. Utilizou-se para a recuperação antigênica o calor (microondas Eletrolux), com solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0, na potência máxima. O bloqueio da peroxidase endógena foi similar ao das MMPs. O complexo secundário utilizado foi de amplificação por polímeros livres de biotina (kit Envision, cod. K4065, DakoCytomation). A solução tampão utilizada foi o Tris HCl, pH 7,4.

O protocolo para o anticorpo anti-TNF- α foi semelhante ao do anti-TGF- β , porém a diluição do anticorpo primário foi de 1:25 (Tabelas 1 e 2). Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por Tris-HCl, pH 7,4 em todas as reações imuno-histoquímicas. O controle positivo do anticorpo anti-TNF- α foi linfonodo de bovino com granuloma tuberculóide, que segundo a literatura apresenta um perfil de citocinas Th1 (Ackermann, 2009).

Tabela 1 - Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas na pele de cães com LV.

ANTICORPO	PROCEDÊNCIA	DILUIÇÕES	ESPÉCIE
Anti-MMP-2 (P)	ab79781 (Abcam)	1:250	Coelho
Anti-MMP-9 (P)	ab38898 (Abcam)	1:4500	Coelho
Anti-TGF-beta (P)	SC-146 (Sta Cruz)	1:500	Coelho
Anti-TNF-alfa (M)	SC-80386 Sta Cruz	1:25	Camundongo

(P): Policlonal; (M): Monoclonal.

Tabela 2 - Tipo de recuperação antigênica e tempo para cada anticorpo primário.

ANTICORPO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	TEMPO	Incubação do anticorpo primário
Anti-MMP-2	Banho-Maria 95°C	30 minutos	4°C por 18 h
Anti-MMP-9	Banho-Maria 95°C	30 minutos	4°C por 18 h
Anti-TGF-beta	Microondas	15 minutos*	4°C por 18 h
Anti-TNF-alfa	Microondas	15 minutos*	4°C por 18 h

*Potência máxima: 15 minutos, com reposição de tampão a cada 5 min.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS MMP-2 E MMP-9 POR MEIO DE ZIMOGRÁFIA

Para investigar a presença das enzimas MMP-2 e MMP-9 nas amostras de pele, um “pool” de tecido cutâneo de tamanho aproximadamente 1,5x1cm, incluindo as três áreas analisadas (A, B, C) foi submetido à análise por zimografia. Fragmentos de pele foram colhidos e estocados em criotubos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a – 80°C, para posterior análise da atividade enzimática.

No momento da análise da atividade enzimática, as amostras da pele foram maceradas juntamente com um tampão de lise (50mM Tris-HCl, pH 7,6; 150mM NaCl; 5mM CaCl₂; 0,05% Brij- 35®, água destilada qsp – 1000mL). Posteriormente este homogenado foi centrifugado (12000xg) por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi

distribuído em alíquotas de 50uL e armazenado a -20°C , para posterior análise. Todos os passos deste procedimento foram realizados com as amostras imersas em gelo (4°C).

A quantificação da proteína total da pele foi feita pelo método do ácido bicinonínico (BCA, 23225, Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA). Esta análise foi feita para padronizar a concentração proteica utilizada nos géis de zimograma.

A atividade enzimática destas amostras foi detectada por SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis), zimografia modificada, de acordo com Machado et al. (2010). Os géis de poliácridamida (10%) foram associados à gelatina (G8150-100G, Sigma–Aldrich). Amostras com a concentração proteica previamente padronizada (10µL) foram colocadas juntamente com uma solução tampão (10µL), contendo 125mM Tris–HCl, pH 6.8; glicerol 20% (v/v), SDS 4% (w/v), e azul de bromofenol 0.2% (w/v). As amostras foram submetidas a eletroforese a 4°C por 3 horas. Posteriormente, os géis foram colocados em Triton X-100 2,5% (v/v) por 30 minutos, para remoção do SDS e incubados com o tampão de ativação enzimática contendo 50mM Tris, 200mM NaCl, 5mM CaCl_2 , e Brij-35 0.2% (w/v), pH 7,5, por 20 horas a 37°C , sob agitação suave. Após a incubação, os géis foram corados com Coomassie brilliant blue R-250 0.5% (w/v), metanol 45% (v/v), e ácido glacial acético 10% (v/v) por 30 minutos e posteriormente descorados com metanol 45% (v/v) e ácido glacial acético 10% (v/v) por 30 minutos. A presença de MMPs nas amostras foi evidenciada pelo aparecimento de bandas claras se destacando corado em azul-escuro. Para o controle positivo da zimografia foi utilizado amostra de adenocarcinoma mamário de cadela, conforme previamente padronizado (MACHADO et al., 2010).

As imagens dos géis foram capturadas por densitometria óptica (Image Quant-LAS 4000) e os resultados analisados por meio do *software* de domínio público, ImageJ 1.45s (Wayne Rasband, National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A determinação da densidade de células imunomarcadas para os diferentes anticorpos testados na técnica de imuno-histoquímica foi realizada considerando cinco campos microscópicos (obj. 40x), determinando a média de células imunomarcadas por animal, pela somatória destes campos.

Para a análise estatística do perfil celular do infiltrado inflamatório (escores) e da média de células imunomarcadas para carga parasitária, MMP-2, MMP-9 e TGF- β , utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com a comparação entre grupos (assintomático, oligossintomático, sintomáticos) e entre áreas (focinho, orelha e abdômen) pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn.

A determinação da atividade gelatinolítica no “pool” de regiões da pele (focinho, orelha e abdômen) foi feita pelo Teste não paramétrico de Mann Whitney, entre os grupos infectado (sintomáticos, assintomáticos e oligossintomáticos) e controle (não infectado). O Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn foram utilizados para mostrar a predominância das formas latente e ativa das MMPs 2 e 9 nos mesmos grupos.

O programa estatístico utilizado foi Graphpad Prism (versão 4.0, 2003). Em todos os testes, as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

V- RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Na análise histopatológica, o infiltrado inflamatório cutâneo apresentou frequentemente uma distribuição multifocal a coalescente, predominante na derme superficial e ao redor de anexos cutâneos das regiões da orelha, focinho e abdômen. Este infiltrado era composto por plasmócitos, linfócitos, mastócitos e macrófagos reativos e/ou parasitados, formando granulomas com bordas pobremente definidas. Quando a inflamação era composta por macrófagos altamente parasitados, não se observava a formação do granuloma multifocal, apenas um infiltrado difuso. Notou-se que a maior intensidade do infiltrado inflamatório foi observada nas regiões da orelha, seguida do focinho. Na orelha, principalmente nos cães sintomáticos, a distribuição da inflamação era difusa (Figura 1).

A intensidade de inflamação variou de discreta a moderada, com distribuição predominante multifocal, nos grupos A e O. No grupo O, as diferenças foram observadas no focinho, entre a distribuição multifocal e ausência de inflamação ($P=0,0041$), no abdômen nas mesmas distribuições ($P=0,0025$) e, na orelha entre a distribuição focal e ausência de inflamação ($P=0,0147$). No grupo assintomático verificou-se diferenças somente na pele da orelha ($P=0,0224$) entre a distribuição multifocal e ausência de inflamação. Já no abdômen ($P=0,0168$) houve diferença entre a distribuição focal e ausência de inflamação (Figuras 2 e 3).

No grupo S os escores moderado e acentuado foram mais frequentes e as lesões tiveram distribuição multifocal a difusa (Figura 3), sendo que o focinho apresentou diferença significativa ($P=0,0235$) entre as distribuições difusa e multifocal (Figura 3C).

A ausência de inflamação foi observada em cães dos grupos A e O, com maior número de animais do grupo A (Figuras 2 e 3).

Nas áreas onde havia inflamação observava-se graus variados de dissociação de fibras colágenas da derme, acantose e hiperqueratose da epiderme e por vezes, ulceração epidermal.

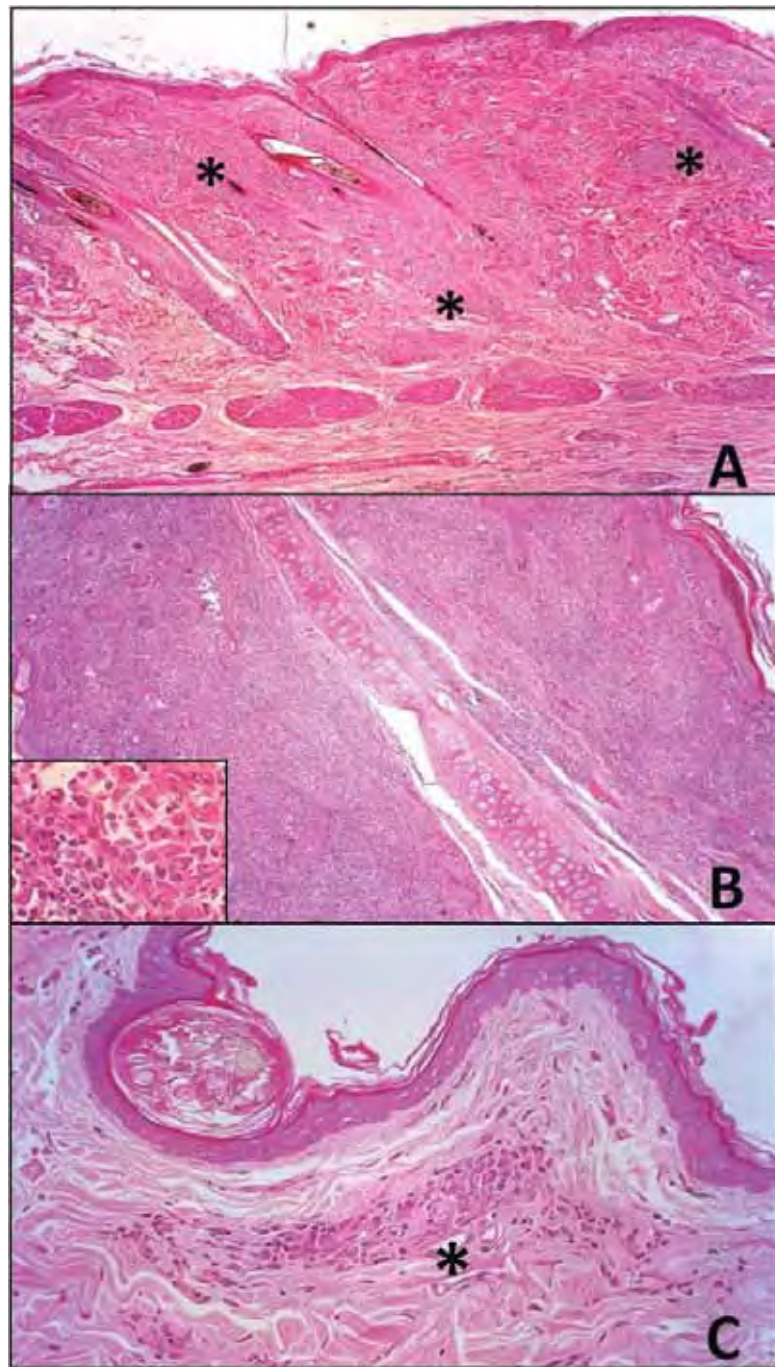


Figura 1 – Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Focinho. Infiltrado inflamatório multifocal (*) ao redor de anexos. (B) Orelha. Infiltrado inflamatório difuso. Detalhe; infiltrado inflamatório predominante de macrófagos e plasmócitos. (C) Abdômen. Foco granulomatoso na derme superficial (*). Hematoxilina Eosina. Obj. 40x.

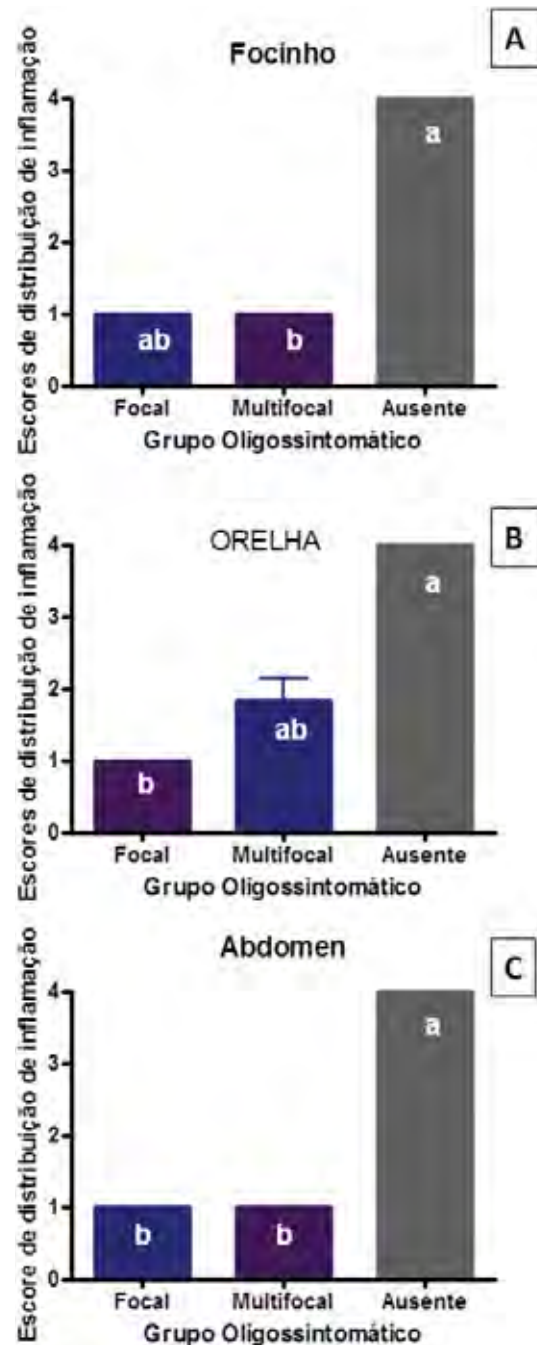


Figura 2 – Distribuição e intensidade do infiltrado inflamatório na pele de cães com Leishmaniose Visceral. Observar no grupo oligossintomático animais sem inflamação na pele das regiões do focinho (A), orelha (B) e abdômen (C). Letras diferentes são significativas pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P < 0,05$).

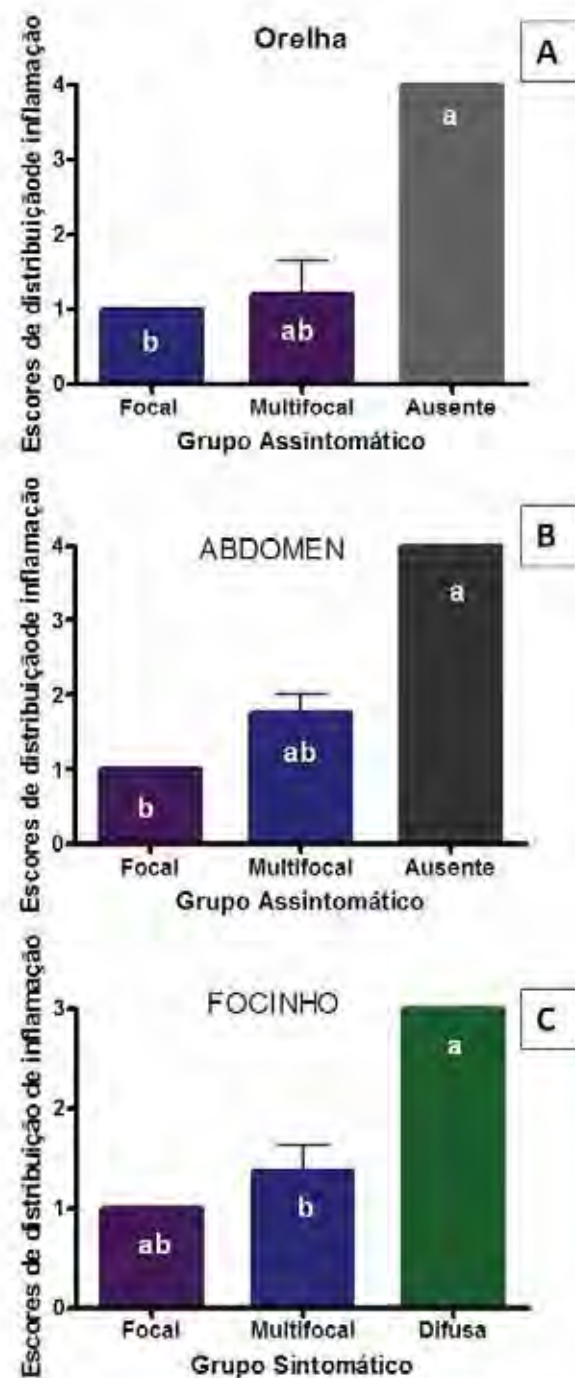


Figura 3 - Distribuição do infiltrado inflamatório na pele de cães com Leishmaniose Visceral. Observar nos grupos assintomático e sintomático a distribuição da inflamação cutânea das regiões do focinho (A), orelha (B) e abdômen (C). Letras diferentes são significativas pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P < 0,05$).

Na análise do perfil celular da inflamação nas diferentes regiões estudadas verificou-se que no grupo sintomático houve diferença significativa, com predomínio de macrófagos em relação aos linfócitos, no focinho ($P=0,0063$), orelha ($P=0,0074$) e abdômen ($P=0,0241$), como pode ser observado na Figura 4. Nos grupos oligossintomático e assintomático não houve diferença quanto ao tipo celular presente no infiltrado inflamatório cutâneo.

Em resumo, quando os animais apresentavam infiltrado inflamatório acentuado, sua distribuição geralmente era difusa, e quando este infiltrado inflamatório era de moderado a discreto, este se distribuía de focal a multifocal, com predominância na derme superficial e ao redor dos anexos cutâneos. Somente nos casos de inflamação difusa, rica em macrófagos parasitados é que o infiltrado estendia-se para as porções mais profundas da derme ou para o tecido adiposo. Nestas situações era comum observar uma completa degradação do colágeno dermal.

Em um animal sintomático foi possível verificar a co-infecção da pele com ectoparasitos, como é o caso do ácaro *Sarcoptes scabiei*, presentes em galerias na epiderme hiperqueratótica.

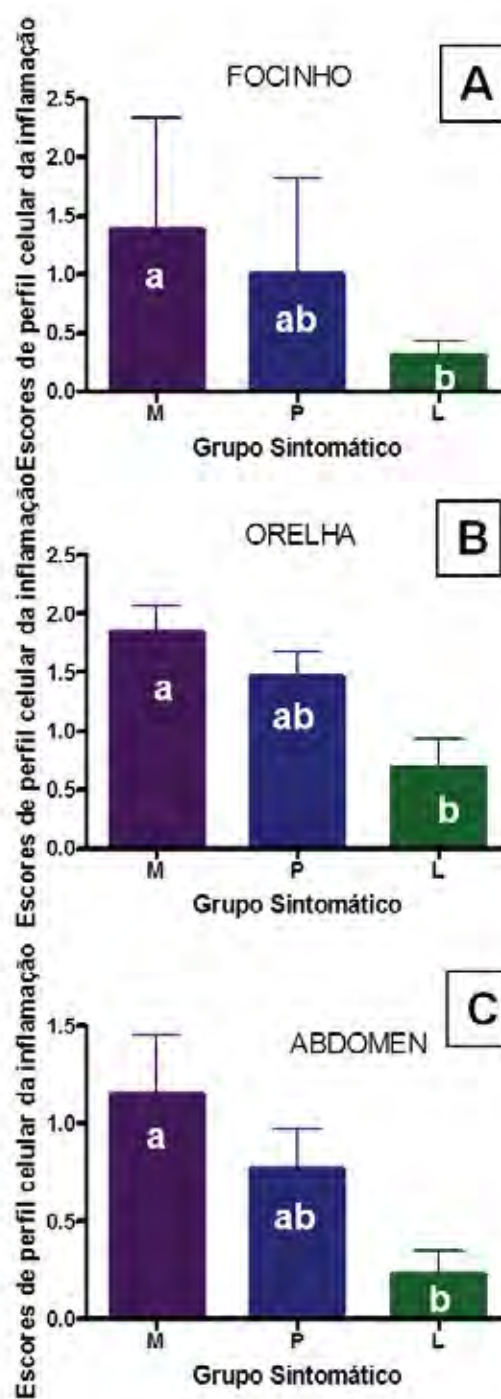


Figura 4 – Perfil celular predominante na inflamação cutânea em cães com Leishmaniose Visceral. Grupo sintomático predominância de macrófagos (M), nas regiões do focinho (A), orelha(B) e abdômen (C). Letras diferentes são significativas pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P < 0,05$). P= plasmócitos; L= linfócitos.

Nos corados com Azul de Toluidina foi possível observar mastócitos associados às células inflamatórias presentes no infiltrado cutâneo, em derme superficial e ao redor de anexos (Figura 5).

Na comparação da densidade de mastócitos entre os grupos, observou-se que o grupo que apresentou a maior proporção foi o oligossintomático ($P=0,0155$), com diferença dos grupos assintomático e sintomático (Figura 6).

Efetuando-se a análise da densidade de mastócitos nas três regiões da pele (Figura 7), foi possível observar que a orelha apresentou um maior número de mastócitos nos três grupos. No grupo assintomático houve diferença ($P=0,0004$) entre o focinho e a orelha e entre a orelha e o abdômen. No grupo oligossintomático houve diferença ($P=0,0005$) nas mesmas áreas. O mesmo foi observado no grupo sintomático ($P=0,0004$).

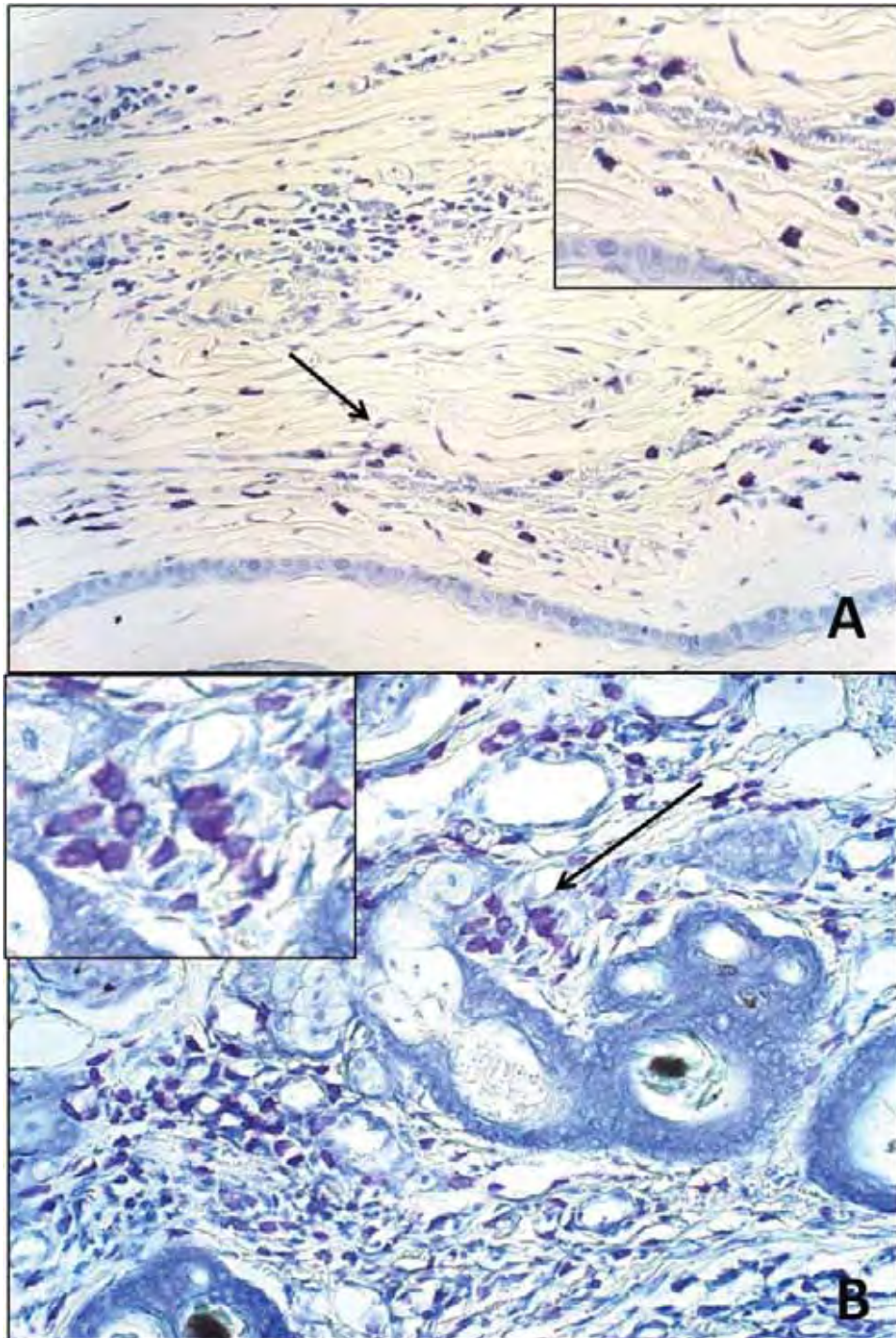


Figura 5 – Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Abdomên. Mastócitos associados às células inflamatórias presentes no infiltrado cutâneo em derme superficial (seta). (B) Focinho. Infiltrado de mastócitos ao redor de anexos. Azul de Toluidina. Obj. 40x.

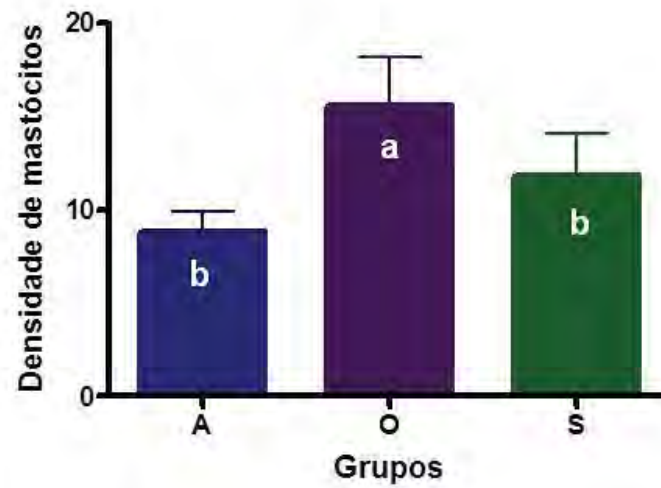


Figura 6 – Média e erro-padrão da densidade de mastócitos entre os grupos assintomático (A), oligossintomático (O) e sintomático (S). Médias indicadas por letras minúsculas distintas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn.

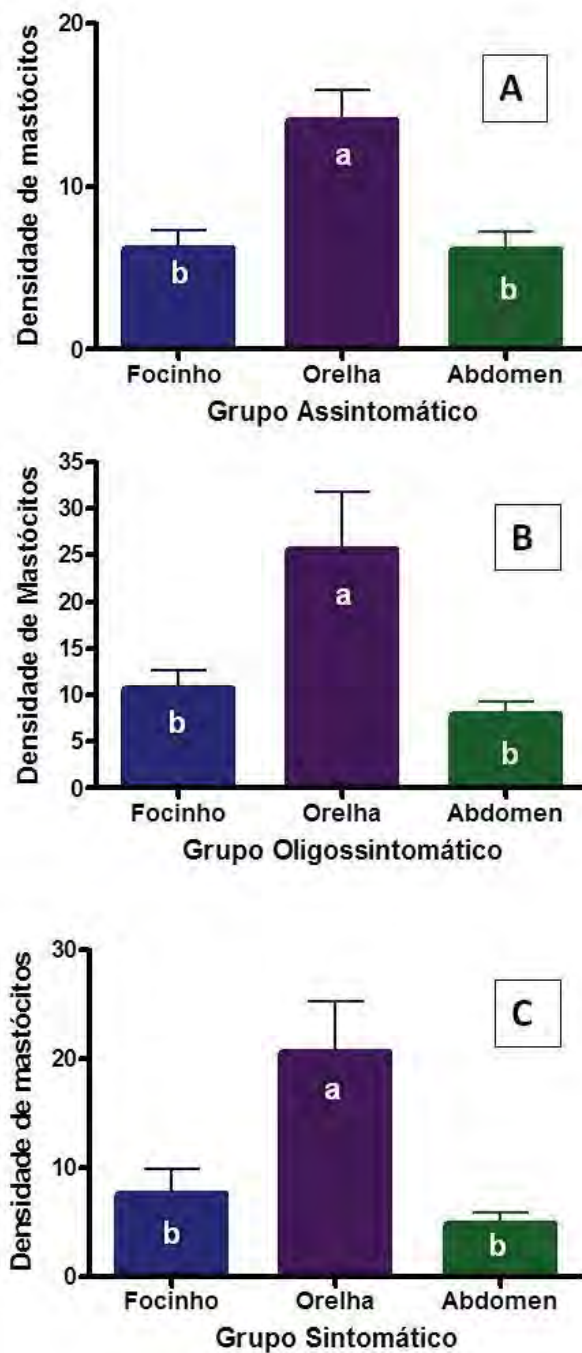


Figura 7 – Densidade de mastócitos de cães dos grupos assintomático, oligossintomático e sintomático para Leishmaniose Visceral, na pele das regiões do focinho (A), orelha (B) e abdômen (C). Letras diferentes são significativas pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($P < 0,05$).

Na coloração de Picrus Sirius Red, a intensidade de degradação do colágeno maduro dermal teve a mesma intensidade e localização do infiltrado inflamatório cutâneo, principalmente em animais com sinais clínicos mais avançados de LV (sintomáticos). Essa degradação caracterizou-se pela ausência de fibras colágenas maduras nos mesmos locais onde localizava-se o infiltrado inflamatório.

Nos animais com alta densidade de parasitos no interior de macrófagos, a degradação do colágeno maduro dermal foi intensa (Figura 8). A presença de fibras colágenas mais delgadas, frouxamente distribuídas e pobremente birefringentes foi observada em intensidade discreta (colágeno tipo III). Quando havia predomínio de macrófagos altamente parasitados, quase não havia a presença de colágeno.

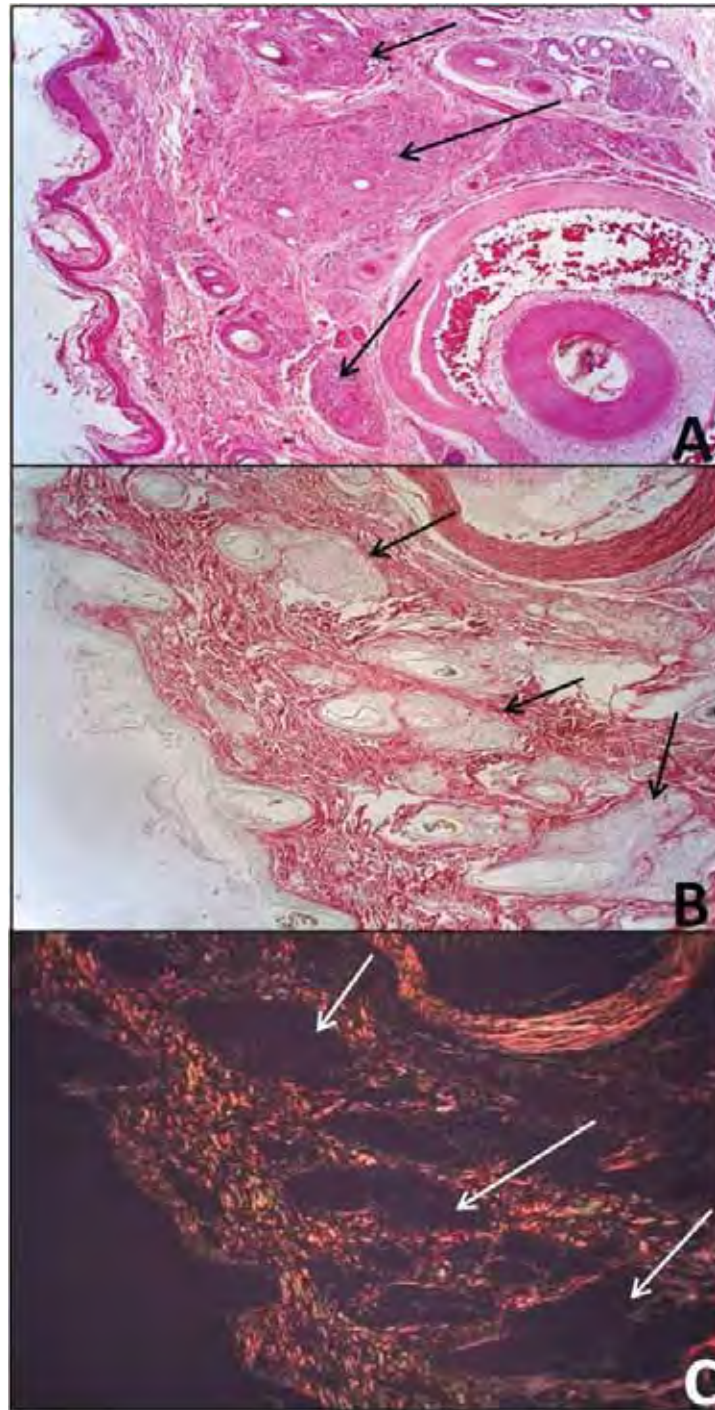


Figura 8 - Fotomicrografias da pele focinho de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Inflamação multifocal (Hematoxilina e Eosina) ao redor de anexos cutâneos (setas). (B) Coloração Sirius Red com luz halogenada. (C) Coloração Sirius Red com luz polarizada. Intensa degradação do colágeno. (setas). Obj. 40x.

5.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Na determinação de células parasitadas, formas amastigotas do protozoário foram imunomarcadas e observadas predominantemente no citoplasma de macrófagos, em fibroblastos da derme superficial e ao redor de anexos cutâneos (Figura 10).

Na análise da carga parasitária quando comparou-se as áreas dentro dos grupos, não houve diferença significativa entre os animais assintomáticos ($P=0,8634$), oligossintomáticos ($P=0,1341$) e sintomáticos ($P=0,0732$). Entretanto, quando a comparação foi feita entre os grupos, independente de área, houve diferença significativa ($P=0,0005$) entre os grupos assintomático para o sintomático e do oligossintomático para o sintomático (Figura 9).

Nos grupos A e O verificou-se uma grande variação entre as áreas, para a densidade de células parasitadas, mas a orelha e o focinho respectivamente, foram as áreas que apresentaram a maior densidade de parasitos. O mesmo foi observado no grupo S.

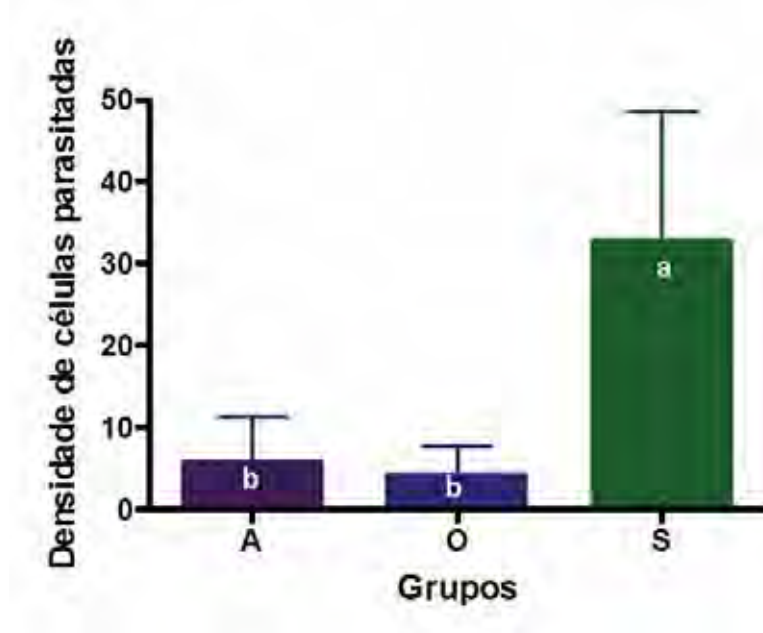


Figura 9 – Média e erro-padrão da densidade de células parasitadas na pele de cães dos grupos assintomático (A), oligossintomático (O) e sintomático (S) para Leishmaniose Visceral. Médias indicadas por letras minúsculas distintas diferem significativamente ($P<0,05$) pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn.

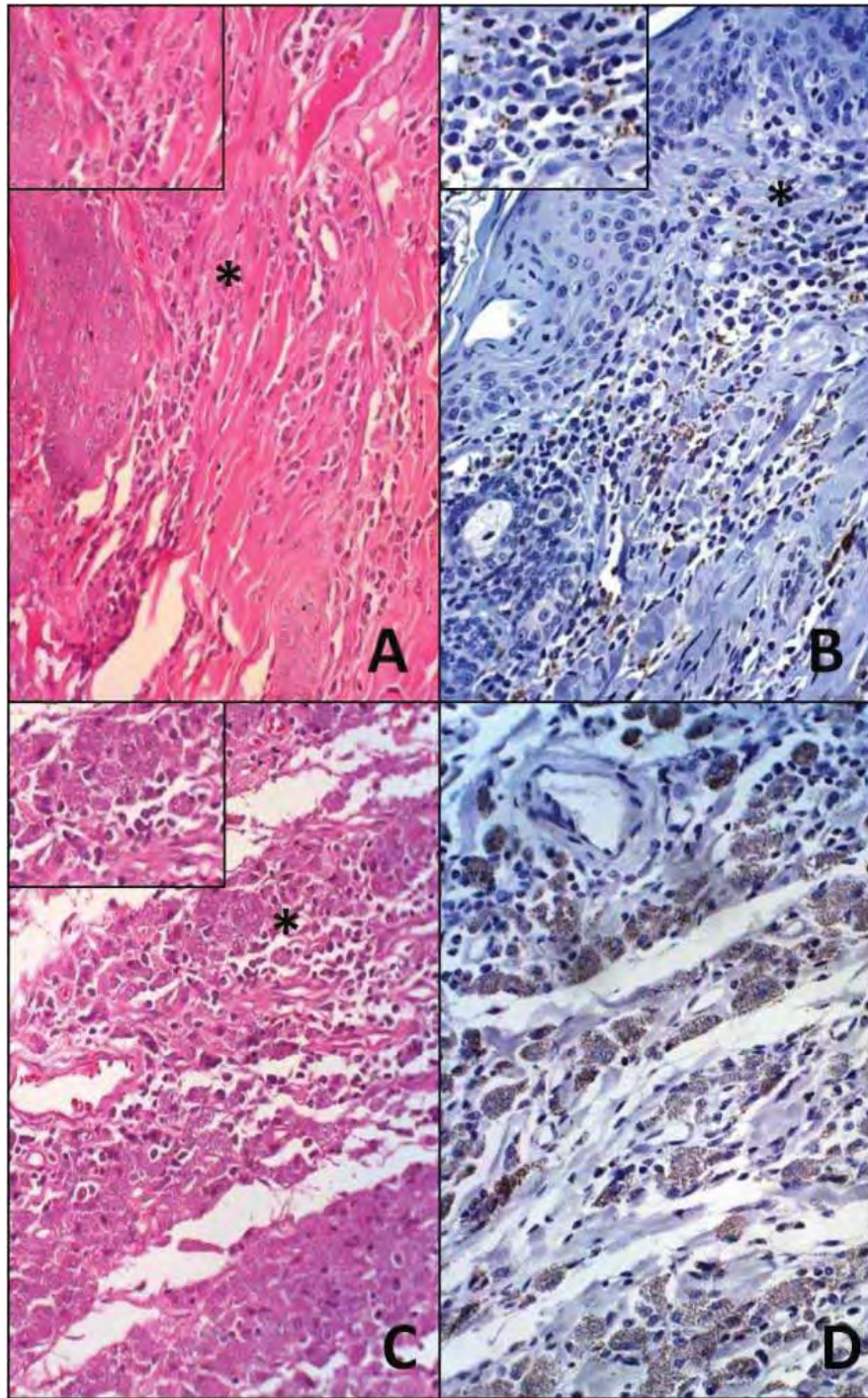


Figura 10 - Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A/C) Focinho e abdômen. Inflamação granulomatosa rica em parasitas (Hematoxilina e Eosina). (B/D) Focinho e abdômen. Imunomarcação para *Leishmania chagasi* (Imunohistoquímica). Obj. 40x.

A marcação imuno-histoquímica positiva para MMP-2 (Figura 11) e MMP-9 (Figuras 12) foi observada no citoplasma de macrófagos, linfócitos, mastócitos e plasmócitos do infiltrado inflamatório. Outros tipos celulares e tecidos, tais como os fibroblastos, fibras colágenas, a epiderme, o epitélio dos folículos pilosos e os condrócitos da cartilagem da orelha também apresentaram imunomarcação.

A imunomarcação para a citocina TGF- β foi predominante na membrana citoplasmática de linfócitos, macrófagos e de alguns neutrófilos na derme superficial e ao redor de anexos cutâneos (Figura 13). Notou-se marcação também no tecido conjuntivo da derme superficial.

Na análise estatística da densidade de células imunomarcadas para TGF- β , não houve diferença significativa entre os grupos assintomático ($P=0,2090$), oligossintomático ($P=0,2255$) e sintomático ($P=0,8037$). O grupo controle não apresentou imunomarcação para TGF- β .

A citocina TNF- α não foi detectada na maioria dos cães dos grupos infectados e em nenhum cão do grupo controle. O linfonodo bovino com granuloma tuberculóide apresentou marcação positiva para esta citocina.

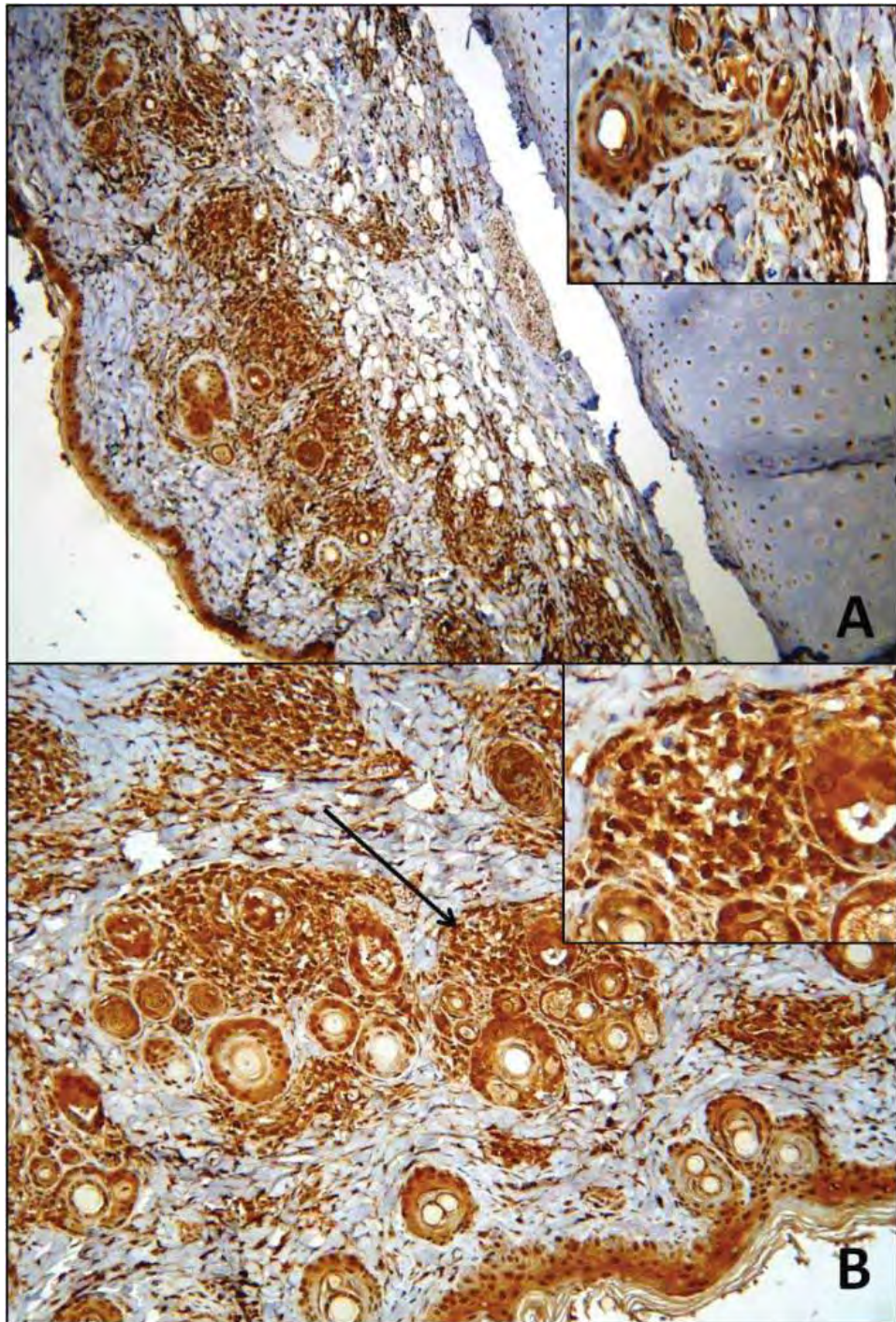


Figura 11 - Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A) Região de orelha. Imunomarcação para MMP-2 em inflamação granulomatosa em derme superficial. (B) Focinho. Imunomarcação ao redor de anexos cutâneos e epitélio (Complexo de polímeros ligados a peroxidase). A / Obj. 10x e B / Obj. 20x.

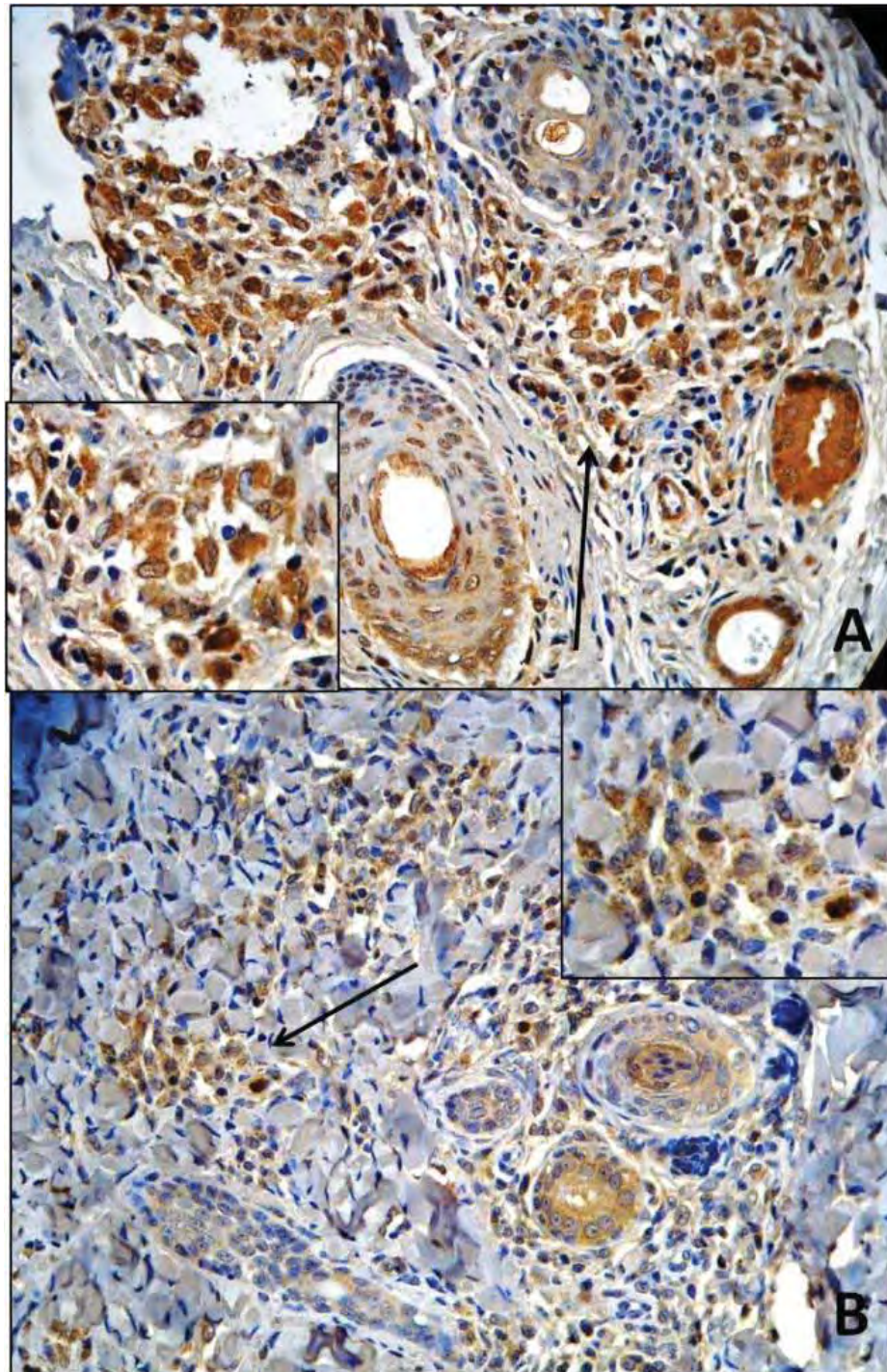


Figura 12 - Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A/B) Região de focinho. Imunomarcação para MMP-9 (setas) em inflamação granulomatosa ao redor de anexos cutâneos (Complexo de polímeros ligados a peroxidase). Obj. 40x.

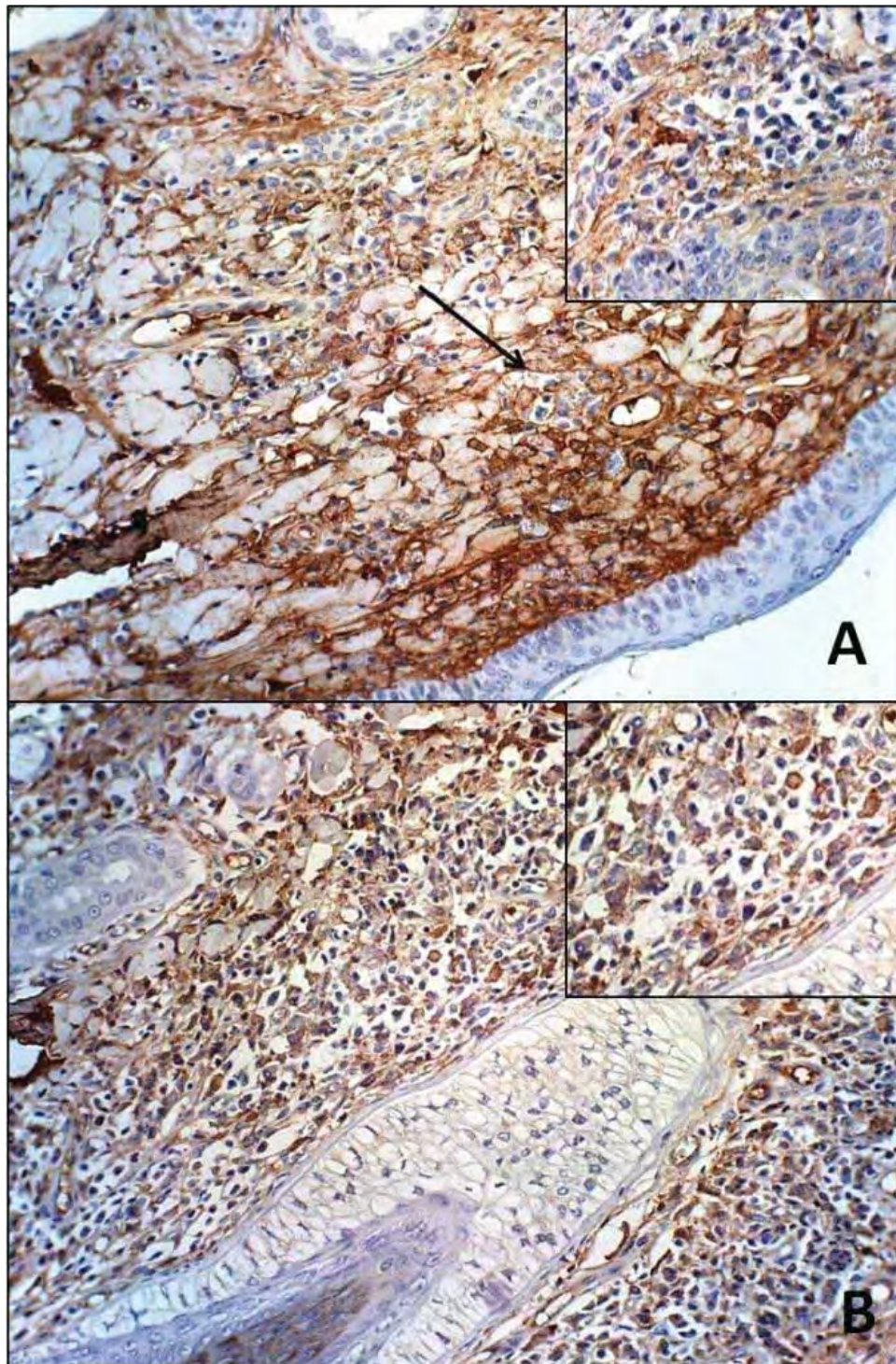


Figura 13 – Fotomicrografias da pele de cão sintomático para Leishmaniose Visceral. (A/B) Focinho. Imunomarcação para TGF- β (detalhes) em inflamação granulomatosa ao redor de anexos cutâneos. (Complexo secundário de amplificação por polímeros livres de biotina). Obj. 40x.

5.3 ZIMOGRRAFIA

A análise zimográfica revelou atividade gelatinolítica relacionada a enzimas com peso molecular de 92 (pro-MMP-9), 86 (MMP-9 ativa), 72 (pro-MMP-2) e 66 kDa (MMP-2-ativa), detectadas no “pool” de áreas da pele de cães infectados e cães controle (Figura 14).

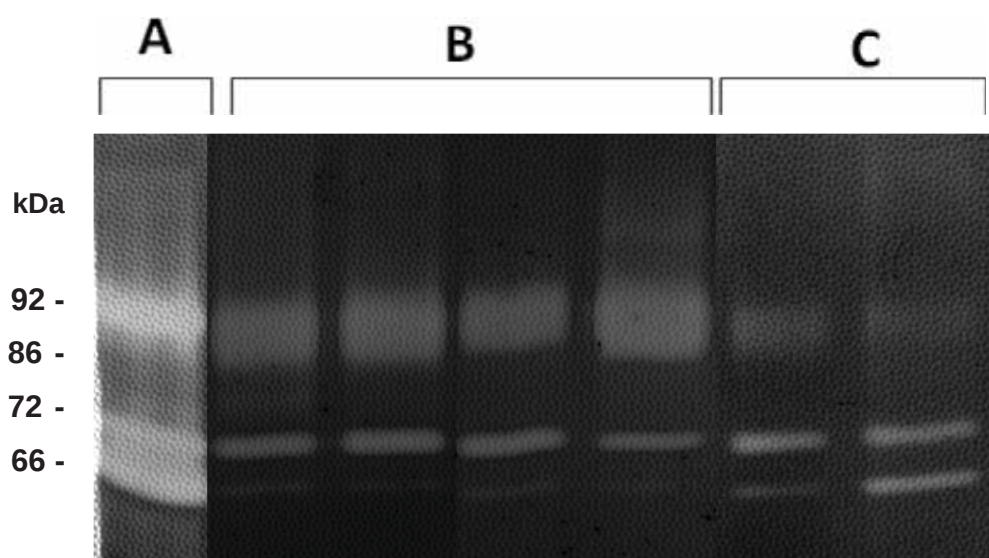


Figura 14 – Zimograma representativo da pele de cães com Leishmaniose Visceral apresentando bandas gelatinolíticas correspondendo a pro-MMP-9 (92 kDa), MMP-9 ativa (86 kDa), pro-MMP-2 (72 kDa) e MMP-2 ativa (66 kDa). (A) Peso molecular (adenocarcinoma de glândula mamária usado como controle positivo). (B) Cães infectados sintomáticos. (C) Cães não infectados (grupo controle).

A atividade gelatinolítica foi comparada na pele das três regiões (focinho, orelha, abdômen) da pele dos cães com LV, onde observou-se uma diferença significativa na expressão de MMP-9 ativa ($p=0,0122$) quando comparado aos animais controle. Quando estas regiões foram analisadas separadamente, notou-se no focinho uma maior expressão de MMP-9 latente ($p=0,0106$), MMP-9 ativa ($p=0,0115$) e MMP-2 ativa

($p=0,0249$), quando comparado ao grupo controle. Na orelha também houve uma maior expressão de MMP-9 latente ($p=0,0409$), MMP-9 ativa ($p=0,0067$) e MMP-2 ativa ($p=0,0384$). Já no abdômen não houve diferença significativa na expressão das MMPs nos animais infectados quando comparados ao grupo controle. Estes resultados estão demonstrados nas Figuras 15 e 16.

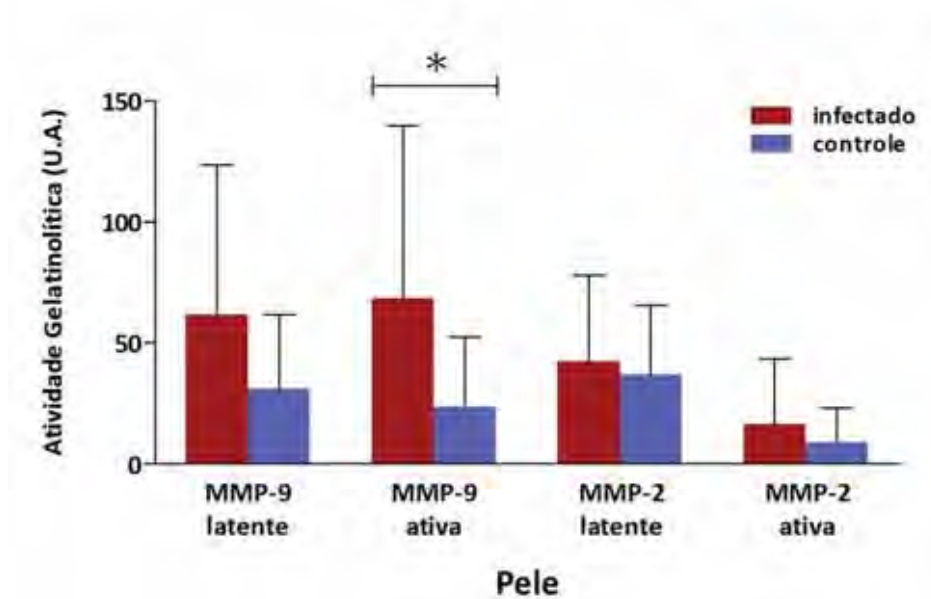


Figura 15 – Atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 na pele de cães com Leishmaniose Visceral. Pele total (regiões Focinho + Orelha + Abdômen). Teste de Mann Whitney- MMP-9 latente ($P=0,1166$); MMP-9 ativa ($P=0,0122^*$); MMP-2 latente ($P=0,7147$); MMP-2 ativa ($P=0,1762$).

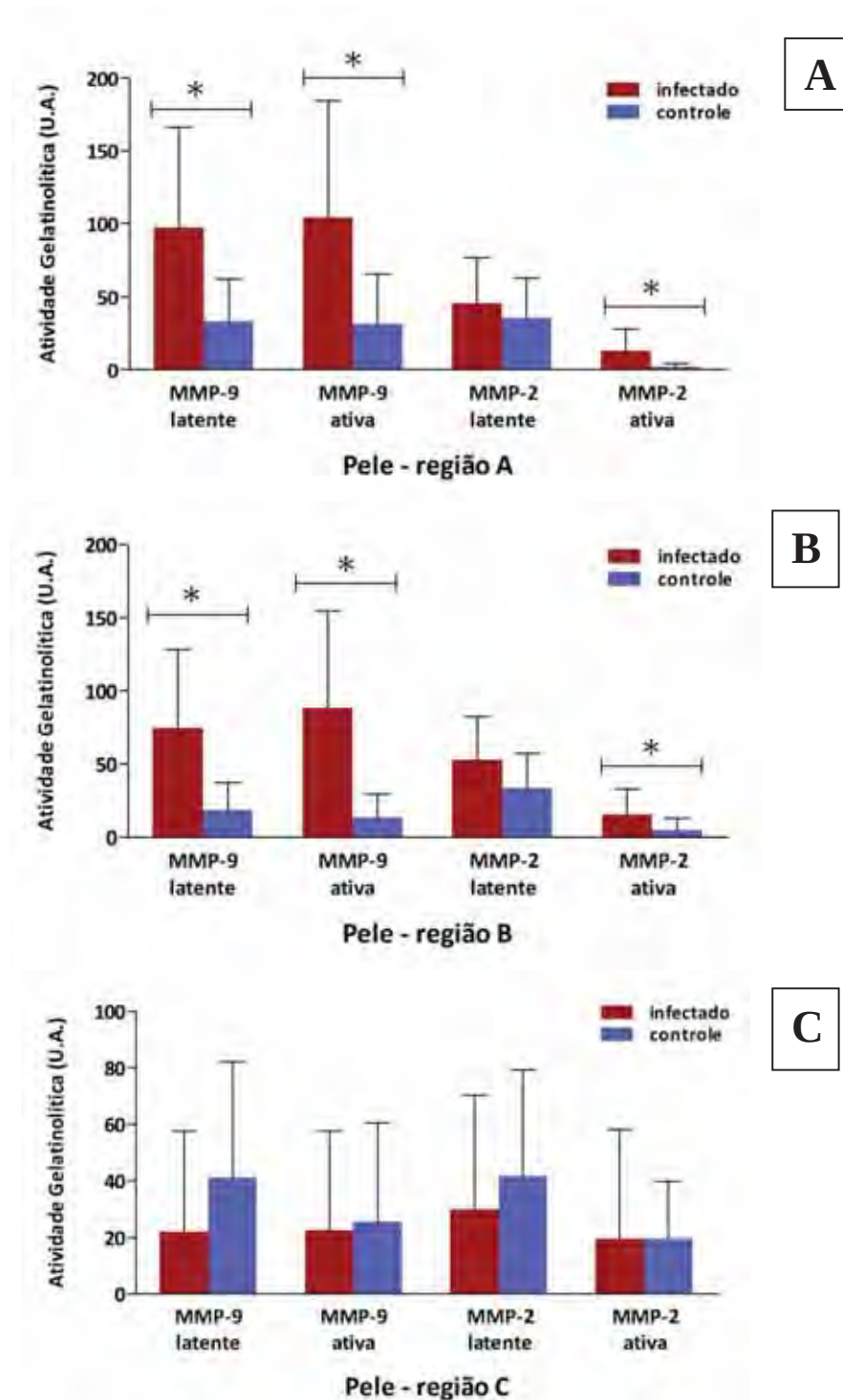


Figura 16 - Atividade gelatinolítica da pele de cães com Leishmaniose Visceral. (A) Pele região A (focinho). MMP-9 latente ($P=0,0106^*$); MMP-9 ativa ($P=0,0115^*$); MMP-2 ativa ($P=0,0249^*$). (B) Pele região B (orelha) MMP-9 latente ($P=0,0409^*$); MMP-9 ativa ($P=0,0067^*$); MMP-2 ativa ($P=0,0384^*$). (C) Pele região C (abdômen). Teste de Mann Whitney

Quando a atividade gelatinolítica da pele dos cães com LV foi comparada entre os grupos (assintomático, oligossintomático, sintomático e grupo controle), observou-se uma diferença significativa na expressão de MMP-9 ativa ($P=0,0151$) no grupo assintomático quando comparado ao grupo controle (Figura 17).

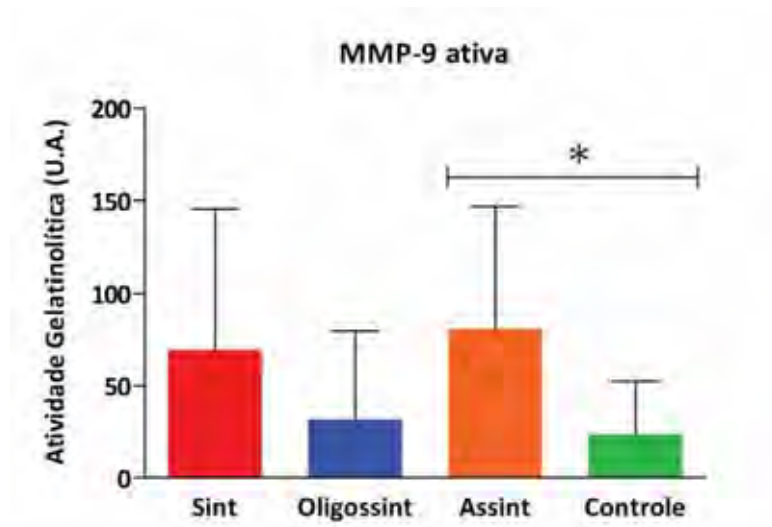


Figura 17 – Atividade gelatinolítica da pele de cães com Leishmaniose Visceral. Grupos assintomático, oligossintomático, sintomático e controle. Teste de Comparação Múltipla de Dunn. MMP-9 ativa ($P=0,0151^*$).

VI- DISCUSSÕES

No presente estudo, o macrófago foi o tipo celular predominante no infiltrado inflamatório nas três regiões da pele, com presença evidente de mastócitos, principalmente nos grupos S e O. No entanto, a fase da infecção não foi possível ser determinada, pelo fato dos cães infectados apresentarem doença espontânea. Giunchetti et al. (2006) observou predominância de infiltrado plasmocitário na derme superficial e profunda de cães com LV, com uma menor proporção de macrófagos e linfócitos. A distribuição deste infiltrado era difusa e ao redor dos folículos pilosos, principalmente na região da orelha. Penha et al. (2010) estudaram cães da mesma área endêmica para LVC e observaram perfil similar de leucócitos, com predominância de macrófagos ($P=0,0533$) na região da orelha e diferenças entre o grupo A com os grupos S e O. No atual estudo, as regiões com maior intensidade de lesões coincidiram com as observadas por estes autores. Nos casos de inflamação difusa, rica em macrófagos parasitados, o infiltrado estendia-se para o tecido adiposo, sugerindo que os macrófagos repletos de formas amastigotas do parasita estavam prestes a invadir o leito vascular, para chegar aos linfonodos periféricos e posteriormente disseminar-se para o organismo do cão. Moreira et al. (2010) verificaram lesões mais severas no linfonodo poplíteo de cães da mesma área endêmica para LVC, observando também um predomínio de macrófagos associados a carga parasitária elevada e atrofia linfóide no grupo sintomático. Nos mesmos animais, Moreira (2010) observou que a atrofia linfóide ocorreu por apoptose de linfócitos T, sugerindo que este processo seria um mecanismo de evasão imune do parasito.

Os plasmócitos foram o segundo tipo celular mais abundante do infiltrado inflamatório cutâneo e não diferiram dos macrófagos no grupo S. Estas células podem refletir um perfil de resposta humoral, já que a presença de plasmócitos com corpúsculos de Russell foi um achado comum. Sabe-se que cães com doença avançada podem apresentar um título elevado de anticorpos, geralmente não protetores contra o parasito e que podem agravar a doença pela deposição de imunocomplexos.

Os imunocomplexos são responsáveis por causar insuficiência renal; e a progressão da doença pode ocasionar o óbito do animal (FEITOSA et al., 2000; BARBIÉRI, 2006).

O perfil estrutural dos granulomas na derme dos cães com LV, do presente estudo, foi do tipo lepromatoso (Th2), com bordas pobremente definidas, predomínio de macrófagos, raros linfócitos e plasmócitos, com carga parasitária variável. Classicamente, os granulomas são divididos em Th1 ou Th2, de acordo com o perfil de citocinas predominante e a via de ativação de macrófagos, via Arg-1 (L-arginina, Th2) ou iNOS (Th1), por linfócitos T CD4, resultando em atividade antifibrótica (Th1) ou deposição exacerbada de fibroblastos e colágeno (Th2) (ACKERMANN, 2009). Na LV canina foi estabelecido que os animais com sinais clínicos mais graves são susceptíveis a proliferação do parasito e apresentam um perfil de resposta imune predominantemente Th2 (BARBIÉRE, 2006; ALVES et al., 2009).

No entanto, no atual estudo, a presença de fibrose associada aos granulomas não foi o aspecto mais importante, mas sim a degradação do colágeno dermal. Portanto, na LVC, outros fatores estão relacionados a alteração da proporção de fibras colágenas maduras. Os macrófagos dos granulomas e os fibroblastos e mastócitos poderiam participar deste processo, produzindo enzimas colagenolíticas (MMPs) ou citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Já no que se refere a composição celular dos granulomas, Moreira et al. (2010) descreveram que nos linfonodos com menor carga parasitária e apoptose, os granulomas apresentavam uma proporção de linfócitos mesclados aos macrófagos, sugerindo uma maior eficiência no controle do parasito, nos grupos A e O.

Na avaliação da carga parasitária foi possível observar que, independente da área, houve diferença significativa ($P=0,0005$) entre os grupos A para o S e do O para o S. Giunchetti et al. (2006) demonstraram similarmente que, a maior carga parasitária encontrada foi no grupo sintomático que diferiu do grupo assintomático. Possivelmente esta localização preferencial na orelha, descrita no presente estudo e por outros autores, esteja associada a maior intensidade de lesões na pele da cabeça, sítio preferencial de acesso do mosquito-palha. Lima et al. (2004) observou lesões mais

severas em linfonodos cervicais de cães com LV espontânea e associou estes achados a área de drenagem destes linfonodos (região da cabeça).

A presença de imunomarcacão para o protozoário *Leishmania* também foi observada em fibroblastos na pele das três regiões dos cães deste estudo. Os fibroblastos produzem proteínas da matriz extracelular, citocinas, MMPs, quimiocinas, que regulam a composicão do microambiente extracelular em condições fisiológicas e patológicas. Nos processos inflamatórios crônicos, estimulados por citocinas e fatores de crescimento, tais como, TGF- β , que proliferaram e aumentaram a síntese de colágeno (ACKERMANN, 2009). No presente estudo, talvez os fibroblastos parasitados ou estimulados por mediadores liberados no sítio de inflamação também possam contribuir para as alteraçōes da derme, principalmente pela liberaçō de enzimas gelatinolíticas (MMPs).

A densidade de mastócitos entre os grupos de cães e regiões da pele foi maior na orelha, nos três grupos clínicos, com maior ênfase no grupo O. Saha et al. (2004) realizaram um estudo comparativo entre camundongos resistentes (BALB/c) e susceptíveis (C57BL/6 e CBAT6T6) a infecçō por *Leishmania* (*Leishmania major* e *Leishmania donovani*) e destacaram que na infecçō experimental por *L. donovani* houve maior densidade de mastócitos no baço dos BALB/c, porém não houve este aumento nos C57BL/6. O mesmo aspecto foi observado na pele na infecçō por *L. major* em uma linhagem susceptível. Este estudo revelou que os mastócitos tem uma funçō pró-parasitária em hospedeiros susceptíveis e anti-parasitária em hospedeiros resistentes. Já Romão et al. (2009) demonstraram experimentalmente que, em mastócitos com degranulaçō induzida, em camundongos de linhagens susceptíveis a infecçō, houve um aumento da resistêcia a infecçō por *Leishmania major*, pois a lesão cutânea reduziu de tamanho e a carga parasitária foi menor.

Neste estudo, a intensidade de destruiçō do colágeno maduro coincidiu com a intensidade de infiltrado inflamatório associado à derme. A formaçō de colágeno jovem foi mais discreta em relaçō a proporçō da degradaçō do mesmo, principalmente nos cães sintomáticos. Contrariando nossos resultados, Melo (2005) avaliou o colágeno da pele de cães com LV e observou que em cães com intenso infiltrado inflamatório, áreas

de necrose e presença de formas amastigotas, houve predominância de colágeno do tipo III (jovem). Giunchetti et al. (2006) também descrevem redução de colágeno tipo I e um aumento do colágeno tipo III, devido aos efeitos deletérios do infiltrado inflamatório. Melo (2005) sugere que as alterações da matriz extracelular seriam decorrentes da ação da *Leishmania* spp., que utiliza o processo de degradação do colágeno do tipo I como um mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro. Esta interação poderia explicar o tropismo específico do parasita pela pele. Do contrário, Kondo et al. (2009) observaram no linfonodo poplíteo de cães com LVC que ocorreu a substituição gradativa do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I. No presente estudo ao invés de ocorrer a substituição do colágeno de um tipo por outro, observou-se a maior degradação do colágeno, possivelmente pela detecção de formas latentes e ativas das MMPs 2 e 9 na pele, mais evidente nos grupos infectados, por meio da técnica de imuno-histoquímica e zimografia. Se considerarmos que a disposição das fibras colágenas da derme normal não seja favorável para a migração leucocitária, seria interessante para o parasito que ocorra uma alteração na proporção de colágeno maduro, como alguns autores destacam ou, como no nosso estudo, uma degradação deste colágeno. Isso favoreceria a migração de macrófagos parasitados para o leito vascular, visando disseminação sistêmica.

As MMPs 2 e 9 na pele de cães com LV foram detectadas principalmente no citoplasma de leucócitos do infiltrado inflamatório e no tecido conectivo cutâneo (fibroblastos, fibras colágenas). Na pele de cães com LV não há relatos de imunomarcagem para MMP 2 e 9, porém Machado et al. (2010) avaliaram as MMP-2 e 9 no cérebro de cães com LV e demonstraram imunomarcagem positiva para MMP-2 e 9 latente em células residentes e do infiltrado inflamatório do parênquima do cérebro e leptomeninges. As MMPs podem ser produzidas por leucócitos (macrófagos, linfócitos, mastócitos), células endoteliais e fibroblastos (ACKERMANN, 2009). No presente estudo, a degradação do colágeno possivelmente foi induzida por fibroblastos, juntamente com os macrófagos e mastócitos ativados, que contribuíram para a produção das MMPs 2 e 9. Da mesma forma, a proporção da forma ativa de MMP-9 foi maior nos grupos infectados, sugerindo que esta enzima seja um bom marcador de

inflamação ativa. Já a MMP-2 teve maior expressão da forma latente, nos grupos infectados. Esta gelatinase é constitutiva, quando comparada a MMP-9 que é induzível (OPDENAKKER et al., 2001). Talvez existam diferenças na fase de expressão destas duas enzimas e MMP-2 seja liberada na primeira fase da infecção e MMP-9 mais tardiamente. Nas condições de nosso estudo utilizaram-se cães com doença espontânea. Apenas na infecção experimental seria possível confirmar esta hipótese.

A orelha e focinho tiveram a maior produção de MMPs, principalmente a MMP-9. Coincidentemente, nestas regiões o infiltrado inflamatório e a densidade de parasitos foram maiores. Sugerindo um processo de degradação induzido pela inflamação, que poderia favorecer a maior mobilidade de macrófagos parasitados atingirem os vasos sanguíneos e linfáticos e disseminarem-se sistemicamente. O grupo assintomático foi o único que apresentou diferença significativa para a MMP-9 ativa em relação ao controle. Possivelmente, esta forma ativa já poderia ter sido produzida e degradada nos demais grupos infectados. Os TIMPs são considerados os principais reguladores teciduais de MMPs (Dzwonek et al., 2004). No estudo atual, possivelmente estes reguladores estariam reduzidos e/ou inibidos pelo parasito, pois a forma ativa de MMP-9 estava aumentada nos grupos infectados em relação ao controle, quando se considerou um “pool” das três áreas da pele. Portanto, em nosso estudo, sugere-se que MMP-2 seja liberada em maior concentração na fase inicial da infecção e na evolução crônica da doença ocorra a predominância de MMP-9. Essa hipótese não pode ser confirmada nas condições do presente estudo, pois se utilizou cães com doença espontânea, sem condições de determinação da fase de evolução da infecção. Talvez, em modelos experimentais fosse possível comprovar esta teoria.

A imunomarcagem para a citocina TGF- β ocorreu em leucócitos e no tecido conjuntivo da derme superficial. Porém, na análise estatística não houve diferença significativa entre os grupos infectados e o grupo controle não apresentou imunomarcagem. Já a citocina TNF- α não teve imunomarcagem significativa nos grupos infectados e controle. O TGF- β tem um papel central na atividade dos fibroblastos e na deposição de colágeno nos processos de reparação da pele, visto que esta citocina é produzida pelas plaquetas e macrófagos e induz a quimiotaxia dos macrófagos, a

migração e proliferação dos fibroblastos e a síntese de colágeno e proteínas da matriz extracelular (ACKERMANN, 2009). No presente estudo, possivelmente o TGF- β participa da regulação e quimiotaxia de macrófagos para formar os granulomas cutâneos, bem como cria um microambiente Th2 favorável ao parasito. Desta forma, a participação de TNF- α estaria inibida e isto explicaria a pobre detecção da mesma por imuno-histoquímica. Possivelmente, outros métodos de detecção seriam indicados para identificar níveis mais baixos desta citocina pró-inflamatória, tais como o PCR em tempo real.

Nos animais do grupo infectado, apesar de não ser possível avaliar a evolução da doença, foi possível observar que quanto mais evidentes os sinais clínicos, maior a intensidade de inflamação e carga parasitária cutânea. Portanto os macrófagos, juntamente com os mastócitos poderiam estar contribuindo para a sobrevivência do parasito na pele, comprovado pela degradação das fibras colágenas maduras e pela produção aumentada de MMPs, principalmente MMP-9 ativa. Estes fatos tornariam a derme mais susceptível a migração de células parasitadas para os vasos sanguíneos, favorecendo a disseminação sistêmica do parasito. Paralelamente, os macrófagos ativados poderiam contribuir também para a manutenção de um microambiente Th2 na matriz extracelular, reforçado pela imunodetecção de TGF- β em diferentes tipos celulares dermais e pela pobre detecção de TNF- α . Desta forma, o parasito estaria protegido do sistema imune do cão, já que a ativação eficiente da atividade microbicida da célula hospedeira estaria inibida. Com isso ocorreria a disseminação da infecção para outros órgãos e a evolução da inflamação para a cronicidade.

VI- CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo foi possível concluir que:

- A inflamação cutânea foi crônica e composta predominantemente por macrófagos e plasmócitos.
- O número de mastócitos foi maior nos locais com maior intensidade de inflamação e parasitos na pele, tais como a orelha.
- As células do infiltrado inflamatório contribuíam para as mudanças da matriz extracelular cutânea, devido a produção de MMP-2 e MMP-9;
- Os cães sintomáticos tiveram as lesões mais graves e a maior carga parasitária cutânea. A orelha e focinho foram as regiões mais afetadas;
- A elevada densidade de parasitos na pele esteve relacionada a inflamação difusa e maior degradação do colágeno dermal;
- A detecção da MMP-9 estava relacionada a maior degradação das fibras colágenas maduras, principalmente no grupo S. As MMPs 2 e 9 tiveram suas formas latente e ativa detectadas principalmente nas áreas com maior intensidade de inflamação;
- O TGF- β foi detectado na pele de cães naturalmente infectados e com lesões mais severas e o TNF- α foi pobremente detectado na pele dos cães dos grupos A, O e S.

REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; MORTARA, R.A.; TEDESCO, R.C.; CARDOSO, F.O.; CARVALHO, L.O.P.; GONÇALVES, DA; COSTA, S.C. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. **Parasitology**. v. 128, p. 385-390, 2004.

ACKERMANN, M.R. Inflamação crônica e cicatrização de feridas. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da patologia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 2009. cap.4, p. 153-191.

ALVES, C.F.; AMORIMB, I.F.G.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.128, p.349-358, 2009.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Chicago, v.218, n.5, p.669-696, 2001.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v.28, p.329-337, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde (MS) / Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120p., 2006.

BRITO, F.L.C. Patologia, resposta imune humoral e diagnóstico em cães com oftalmopatias decorrentes da infecção natural por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. 2006. 55f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CAWSTON T. E.; WILSON A. J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. Vol. 20, No. 5, pp. 983 - 1002, 2006.

CORREA O. **Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos**. Sulina: Porto Alegre, 285p., 1971.

M. M. S. COSTA, W. G. LIMA, M. M. FIGUEIREDO, M. S. M. MICHALICK, W. L. TAFURI & W. L. TAFURI. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology**. v. 45, p.613–616, 2008.

DANTAS-TORRES F. *Leishmania chagasi*: participação do *Rhipicephalus sanguineus* na transmissão. In: 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e 2º Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. **Resumos...** CBPV: Ribeirão Preto, SP. p. 116-117, 2006.

DZWONEK, J., RYLSKI, M., KACZMAREK, L. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. **FEBS Letters**. v. 567, 129–135, 2004.

FEITOSA M.M., IKEDA F.A., LUVIZOTTO M.C.R., PERRI S.H.V. Aspectos Clínicos de Cães com Leishmaniose Visceral no Município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**. ano V, n. 28, p. 36-44, 2000.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 56, p. 319-327, 1997.

FORTES E. **Parasitologia Veterinária**. 4 ed., Ícone: São Paulo, 607p., 2004.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊAOLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal foci. **Journal of Comparative Pathology**. v. 135, p. 100-107, 2006.

GOSH, A.; BANDYOPADHYAY, K.; KOLE, L.; DAS, P.K. Isolation of laminin-binding protein from the protozoan parasite *Leishmania donovani* that may mediate cell adhesion. **Biochemical Journal**. v. 337, 551-558, 1999.

GUTIERREZ, F.R.S.; LALU, M.M.; MARIANO, F.S.; MILANEZI, C.M.; CENA, J.; GERLACH, R.F.; SANTOS, J.E.T.; TORRES-DUEÑAS, D.; CUNHA, F.Q.; SCHULZ, R.; SILVA, J.S. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Infectious Disease**. v. 197, p. 1468-1476, 2008.

IKEDA-GARCIA F.A., MARCONDES M. Métodos de Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Clínica Veterinária**. ano XII, n. 71, p. 34-42, 2007.

JONES, T.C., HUNT, R.D., KING, N.W. **Patologia Veterinária**. Manole: São Paulo, 1415p., 2000.

KONDO, K.R.J., FONSECA, C.C., MATTA, S.L.P., VILORIA, M.I.V. Análise histomorfométrica da matriz extracelular do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 8, p.610-616, agosto 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia – bases patológicas das doenças**. 7 ed., Elsevier : Rio de Janeiro, 1592p., 2005.

KUPAI, K.; SZUCS, G. CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinases activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 2010.

LIRA, R.; ROSALES-ENCINA, J.L.; ARGUELOS, C. *Leishmania mexicana*: binding of promastigotes to type I collagen. **Experimental Parasitology**. v. 85, p. 149-157, 1997.

MACHADO, G. F.; MELO, G. D.; MORAES, O. C.; SOUZA, M. S.; MARCONDES, M.; PERRI, S. H.V.; VASCONCELOS, R. O. . Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, p. 340-345, 2010.

MADEIRA, M.F.; FIGUEIREDO, F.B.; PINTO, A.G.S.; NASCIMENTO, L.D.; FURTADO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; PAULA, C.C.; BOGIO, A.; GOMES, M.C.A.; BESSA, A.M.S.; PASSOS, S.R.L. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**. v. 87, n. 2, p. 260-262, 2009.

MARANGONI, N. R.; MELO, G. D.; MORAES, O. C.; SOUZA, M. S.; PERRI, S. H. V.; MACHADO, G. F. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 330-334, 2011.

MELO, F.A. Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

MELO, F.A. Alterações da matriz extracelular do fígado, baço e linfonodos cervicais de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2008. 101f. Tese (Doutorado em Patologia Geral), Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MELO, G. D.; MARANGONI, N. R.; MARCONDES, M.; LIMA, V. M. F.; MACHADO, G. F. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniosis: a preliminary report. **The Veterinary Journal** (London, England. 1997), v. 188, p. 243-245, 2011.

METCALF, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast Cells. **Physiological Reviews**. v. 77, n. 4, p.1033-1079, 1997.

MICHALICK M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: Neves D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed., cap. 7, p. 41-46, 2005.

MOREIRA, P.R.R. Apoptose em linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária/UNESP, Jaboticabal, 54p., Fev, 2010.

MOREIRA, P.R.R.; VIEIRA, L.M.; ANDRADE, M.M.C.; BANDARRA, M.B.; MACHADO, G.F.; MUNARI, D.P.; VASCONCELOS, R.O. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. v.107, p.605-613, 2010.

NAGASE, H.; WOESSNER, JR. J.F. Matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 31, p. 21491-21494, 1999.

OPDENAKKER, G.; STEEN, P.E.V.D.; VAN DAMME, J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. **Trends in Immunology**. v.22, n.10, p. 571-579, 2001.

OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN; P. E., DUBOIS, B.; NELISSEN, I.; COILLIE, E. V.; MASURE, S.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. **Journal of Leukocyte Biology**. V. 69, June 2001.

PENHA, T.A.; MOREIRA, P. R. R.; BANDARRA, M. B.; JACINTHO, A. P. P.; PRANDINI, M.M.; MUNARI, D. P.; VASCONCELOS, R.O. Apoptose e carga parasitária e sua influência na susceptibilidade de diferentes áreas da pele de cães com Leishmaniose Visceral. In: **XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Campo Grande-MS, 2010.

ROMÃO, P.R.T, SANTIAGO, H.C., RAMOS, C.D.L, OLIVEIRA, C.F.E, MONTEIRO, M.C., CUNHA, F.Q., VIEIRA, L.Q. Mast cell degranulation contributes to susceptibility to *Leishmania Major*. *Parasite Immunology*. v. 31, p.140-146, 2009.

ROSA S., ALMEIDA I.C., OLIVEIRA I.C.S. Leishmaniose Visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**. Ano II, n. 11, p. 24-28, 1997.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 128, p. 87-95, 2009.

SANTIAGO, M. E. B.; VASCONCELOS, R. O.; FATTORI, K. R.; MUNARI, D. P.; MICHELIN, A. F.; LIMA, V. M. F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology** v. 150, p. 283–290, 2007.

SAHA, B., TONKAL, A.M.D.J., CROFT, S., ROY, S. Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection *versus* immune evasion in leishmaniasis. **Clinical Experimental Immunology**. V.137, p.19-23, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORRELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* – infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v. 130, p. 07-12, 2004.

SPINALE, F., G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. **Physiological Reviews** 87: 1285–1342, 2007; doi:10.1152/physrev.00012.2007.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, p. 17-23, 2004.

URQUIHART G. M., ARMOUR J., DUNCAN J.L., DUNN A.M., JENNINGS F.W. **Parasitologia Veterinária**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 273p., 1998.

VERSOÇA, B.L.A.; LEMOS, C.M.; MENDONÇA, I.L.; SILVA, S.M.M.S.; CARVALHO, S.M.; GOTO, H.; COSTA, F.A.L. Transmission potential, skin inflammatory response and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**. v. 4, n. 45, p. 1-7, 2008.

WANG, P.; DAÍ, J.; BAI, F.; KONG, K.; WONG, S.J.; MONTGOMERY, R.R.; MACRI, J.A.; FIKRIG, E. Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile Vírus entry into the brain. **Journal of Virology**. v. 82, n. 18, p. 8978-8985, 2008.