

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

ANA LÚCIA DE OLIVEIRA DOURADO

**Investigação da integridade das barreiras oculares, da
presença de Pro-MMP-2, MMP-2, Pro-MMP-9, MMP-9, e
Dosagem de Proteínas no humor aquoso de cães
naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.**

ANA LÚCIA DE OLIVEIRA DOURADO

Investigação da integridade das barreiras oculares, da presença de Pro-MMP-2, MMP-2, Pro-MMP-9, MMP-9, e Dosagem de Proteínas no humor aquoso de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

Dissertação apresenta à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp – Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestra em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirurgia).

Orientadora: Prof^a Dr^a. Gisele Fabrino Machado

Araçatuba
2019

D739i

Dourado, Ana Lúcia de Oliveira

Investigação da integridade das barreiras oculares, da presença de Pro-MMP-2, MMP-2, Pro-MMP-9, MMP-9, e Dosagem de Proteínas no humor aquoso de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. / Ana Lúcia de Oliveira Dourado. -- Araçatuba, 2019

58 p. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Profª Drª Gisele Fabrino Machado

1. Metaloproteases. 2. Proteínas. 3. Doenças inflamatórias dos olhos. 4. Aparelho lacrimal. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

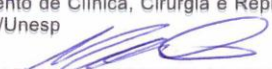
Título: Investigação da integridade das barreiras oculares, presença de Pro-MMP-2, MMP-2, Pro-MMP9 e MMP-9 e Dosagem de Proteínas no humor aquoso de cães naturalmente infectados por Leishmania Infantum

AUTORA: ANA LÚCIA DE OLIVEIRA DOURADO

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Prof. Dra. GISELE FABRINO MACHADO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Araçatuba, 26 de setembro de 2019.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ana Lúcia de Oliveira Dourado- nascida em 26 de dezembro de 1989 na cidade de Araçatuba-SP. Médica Veterinária formada pela Fundação Educacional de Andradina- FEA; no ano de 2012. Iniciou o curso de formação em neurologia de pequenos animais em 2014 no Instituto Bioethicus em Botucatu, tendo concluído em 2015. Iniciou o curso de Pós Graduação em Ciência Animal, área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica em Pequenos Animais na Faculdade de Medicina Veterinária Araçatuba- SP, em 2017, finalizando em setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária - campus de Araçatuba / UNESP por a quase 3 anos ter me proporcionado meios necessários para realização do meu sonho e deste trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Gisele Fabrino Machado por acreditar na minha capacidade, por ter dado tanto incentivo e contribuído para meus ensinamentos que levarei por toda vida.

À Prof^a. Dr.^a SUELY BONFIN MOGNAN pela participação neste trabalho, pelo incentivo, pelo apoio e companheirismo que adquirimos nesse decorrer de tempo.

Ao Prof. PAULO RICARDO DELL'ARMELINA ROCHA pela participação deste trabalho e contribuído para realização do mesmo.

Ao M.V. Guilherme Dias de Melo também pela participação e contribuição deste trabalho.

À Lívia Castanhas Bregano, agora pós doutoranda dessa fundação pelo incentivo, grande apoio e amizade adquirida para realização deste trabalho.

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

Ao Laboratório de Imunologia (FMVA/UNESP) e toda sua equipe.

Ao Setor de Patologia (FMVA/UNESP) e toda sua equipe.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (FMVA/UNESP) pelo incentivo.

Ao Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação (FMVA/UNESP).

Aos membros da banca do Exame Geral de Qualificação, Prof^a. Dr^a. Gisele Fabrino Machado, Prof^a. Dr^a. Lívia Castanhas Bregano e Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles.

Aos membros da banca de Defesa, Prof^a. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Prof^a. Dr^a. Gisele Fabrino Machado, Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles .

À Manoela Cristina de Oliveira, minha mãe, minha inspiração e imenso apoio e amor pra ter chegado até aqui.

À Cacilda Steinle de Oliveira, minha avó, pelo grande incentivo todos esses anos.

A todos os meus amigos que participaram direta e indiretamente, para realização deste trabalho com apoio e incentivo.

“Gosto de Acreditar que trevo de 4 folhas dá sorte;

Que estrela cadente realiza pedidos;

Que no final do arco íris há um pote de ouro;

É a fé nas pequenas coisas que me faz crer que não há limites
para nossos sonhos.”

Autor Desconhecido

Dourado, A.L.O. **Investigação da integridade das barreiras oculares, da presença de Pro-MMP-2, MMP-2, Pro-MMP-9, MMP-9, e Dosagem de Proteínas no humor aquoso de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum***.2019.52f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antroponose sistêmica de evolução crônica, causada pela *Leishmania infantum*, de distribuição mundial, acometendo cães e humanos no ambiente urbano. Nos cães, são observados sinais clínicos frequentes tais como emagrecimento e linfadenomegalia; e existem sinais clínicos menos estudados como as alterações inflamatórias no globo ocular. A hipótese deste estudo é que a ativação de MMPs pode estar envolvida na alteração da permeabilidade das barreiras oculares. Para verificar isto a presença e/ou ativação das metaloproteinases (MMP) 2 e 9, foram quantificadas por meio de zimografia do humor aquoso de 28 cães com LVC e 4 cães do grupo controle. A presença de Pro-MMP-2 foi detectada no humor aquoso de 27 animais do grupo infectado (27/28 cães) e também no grupo controle, sem diferir estatisticamente. A MMP-2 foi detectada no humor aquoso de um animal infectado. Já Pro-MMP-9 (10/28) e/ou sua forma ativa, (11/28) foram observadas em animais infectados e não no grupo controle. Para verificar se a presença das MMPs ativas poderia interferir com a integridade das barreiras oculares em cães com LVC, foi quantificada a presença de proteínas totais no soro e no humor aquoso destes cães. A quantificação de proteínas totais, albumina e globulinas no soro foram semelhantes aos valores citados na literatura no soro de animais com LV. No humor aquoso os valores individuais de proteína total, determinados pelo método Microprot apresentaram variação individual muito grande nos dois grupos, e também não foi observada diferença estatística entre os mesmos. A presença de Pro-MMP-2 em animais do grupo controle comprova a produção constitutiva desta MMP, entretanto, a ausência da forma ativa da MMP-2 nos grupos controle e infectado sugere a não ativação ou inativação eficiente das mesmas por TIMPS. As formas ativas e inativas da MMP-9 foram detectadas apenas no humor aquoso de cães infectados. A albumina, embora seja um marcador utilizado para aferir a permeabilidade das barreiras oculares não se apresentou como um parâmetro efetivo neste experimento devido as limitações do método de detecção utilizado.

Palavras chave: Metaloproteinases. Proteínas. Doenças Inflamatórias dos Olhos. Aparelho Lacrimal.

Dourado, A.L.O. **Investigation of the integrity of eye barriers, the presence of Pro-MMP-2, MMP-2, Pro-MMP-9, MMP-9, and Protein Dosage in aqueous humor of dogs naturally infected with *Leishmania infantum***.2019.52f. (Master's degree)
-Araçatuba Veterinary Medicine College, Paulista State University, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a systemic anthroponosis of chronic evolution, caused by *Leishmania infantum*, worldwide, affecting dogs and humans in the urban environment. In dogs, frequent clinical signs such as weight loss and lymphadenomegaly are observed; and there are less studied clinical signs such as inflammatory changes in the eyeball. The hypothesis of this study is that the activation of MMPs may be involved in altering the permeability of eye barriers. To verify this the presence and / or activation of metalloproteinases (MMP) 2 and 9 were quantified by aqueous humor zymography of 28 dogs with CVL and 4 dogs of the control group. The presence of Pro-MMP-2 was detected in the aqueous humor of 27 animals of the infected group (27/28 dogs) and also in the control group, without statistically differing. MMP-2 was detected in the aqueous humor of an infected animal. Pro-MMP-9 (10/28) and / or its active form (11/28) were observed in infected animals and not in the control group. To verify whether the presence of active MMPs could interfere with the integrity of eye barriers in dogs with CVL, the presence of total proteins in serum and aqueous humor of these dogs was quantified. The quantification of serum total proteins, albumin and globulins were similar to those reported in the literature of serum from animals with VL. In aqueous humor the individual values of total protein determined by the Microprot method showed very large individual variation in both groups, and no statistical difference was observed between them. The presence of Pro-MMP-2 in control group animals proves the constitutive production of this MMP, however, the absence of active form of MMP-2 in the control and infected groups suggests their non-activation or efficient inactivation by TIMPS. Active and inactive forms of MMP-9 were detected only in the aqueous humor of infected dogs. Although albumin is a marker used to measure eye barrier permeability, it was not an effective parameter in this experiment due to the limitations of the detection method used.

Keywords: Metalloproteases. Proteins Inflammatory Eye Diseases. Lacrimal apparatus.

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1- Principais estruturas do globo ocular. 16
- Figura 2- Ilustração dos componentes da Barreira hemato-aquosa: A barreira hemato-aquosa é localizada no corpo ciliar (CP) e composta por segmentos do epitélio não pigmentado (NPE), epitélio pigmentado (PE), capilares fenestrados e pelos capilares não fenestrados da parede interna. 17
- Figura 3- Principais estruturas oculares responsáveis pela formação do humor aquoso. Diagrama esquemático ilustrando a malha trabecular via de saída convencional. O humor aquoso é produzido pelo corpo ciliar e flui (linha tracejada mostrada com setas) de a câmara posterior através da pupila para a câmara anterior. De lá, ele flui através da rede trabecular para dentro do Canal de Schlemm e, posteriormente, absorvido pela episclereral veias através dos canais coletores. 20
- Figura 4- Diagrama esquemático ilustrando a vazão uveoscleral . O humor aquoso é produzido pelo corpo ciliar, em rota uveoscleral, flui da câmara posterior até a pupila na câmara anterior e, em seguida (mostrado por linhas tracejadas e pontas de flecha) através da face do corpo ciliar e raiz da íris para o músculo ciliar e o espaço supracoroidiano de ambas as veias coróide e esclera ou através dos poros esclerais ao tecido episcleral . 20
- Figura 5- Esquema simples destacando o efeito das MMPs na degradação das proteínas da matriz extracelular do globo ocular, como tem sido observado em casos de lesões oculares (ex. degeneração macular, glaucoma, retinopatia do diabetes). 23

2 CAPITULO 1

- Figura 1- Perfil de proteínas do soro dos cães com leishmaniose e do grupo controle. 32
- Figura 2- Valores da densidade óptica (DO) do Humor Aquoso. 33
- Figura 3- Detecção das formas inativas e ativas das metaloproteinases 2 e 9 encontradas no humor aquoso de cães com leishmaniose visceral. 33
- Figura 4- - Diagrama de dispersão 34
- Figura 5- Fotomicrografias de globo ocular de cão com leishmaniose visceral. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Resultados da bioquímica sérica dos cães infectados naturalmente por <i>Leishmania infantum</i> . D.O do soro e humor aquoso, albumina do soro, proteínas totais do soro e do humor aquoso, globulinas do soro e atividade gelatolítica das metaloproteínas 2 e 9	44
Tabela 02 - Resultados da bioquímica sérica dos cães do grupo controle. D.O do soro e humor aquoso, albumina do soro, proteínas totais do soro e do humor aquoso, globulinas do soro e atividade gelatolítica das metaloproteínas 2 e 9	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Leishmanioses	13
1.1.1 Leishmaniose Visceral	13
1.1.2 Leishmaniose Visceral Canina	14
1.1.3 Lesões Oculares na Leishmaniose Visceral	14
1.1.4 Leishmaniose Visceral e Alterações no Humor Aquoso	17
1.1.5 Leishmaniose Visceral e Alterações de Proteínas	21
1.1.6 Leishmaniose Visceral e Metaloproteinases da Matriz	21
2 CAPÍTULO 1 INVESTIGAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS BARREIRAS OCULARES, DA PRESENÇA DE PRO-MMP-2, MMP-2, PRO-MMP-9, MMP-9, DOSAGEM DE PROTEÍNAS NO HUMOR AQUOSO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> .	
2.1 Resumo	24
2.2 Abstract	25
2.3 Introdução	26
2.4 Materiais e Métodos	27
2.4.1 Animais	27
2.4.2 Ética	28
2.4.3 Delineamento Experimental	28
2.4.4 Colheita do material	28
2.5 Dosagem de proteínas totais do humor aquoso	29
2.6 Zimografia	29
2.7 Análise Estatística	30
2.8 Resultados	31

2.9 Discussão	35
2.10 Conclusão	39
2.11 Referências	40
Apêndice “ Referências da Introdução Geral”	46
ANEXO A – Comitê de Ética	51

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Leishmanioses

A leishmaniose é uma zoonose, distribuída em todo mundo, que acomete principalmente cães, humanos. Está presente nos continentes da África, Ásia, Europa, e América do Sul. Corresponde a seis mais importantes endemias do mundo. Atualmente 12 milhões de pessoas são infectadas, com cerca de dois milhões de novos casos ao ano (WHO, 2015). Esta enfermidade é formada por um complexo de doenças com mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, e gênero *Leishmania*). A sua transmissão ocorre por cerca de 30 espécies de mosquitos flebotomíneos (LAINSON; SHAW, 1987; SILVEIRA; CORBETT, 2010). São distintas formas descritas do gênero *Leishmania*, relacionada com a resposta imune do hospedeiro: Leishmaniose visceral; leishmaniose cutânea; leishmaniose muco-cutânea e leishmaniose dérmica pós-calazar (CHAPPUIS et al., 2007). Esses parasitas intracelulares vivem hospedeiros, vertebrados e invertebrados se reproduzindo em forma de divisão binária, no interior de células de mamíferos susceptíveis. A transmissão do parasito ao hospedeiro ocorre pelo repasto sanguíneo de fêmeas da família Phlebotominae do gênero *Lutzomyia* (Pearson E Sousa, 1996).

1.1.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é mais grave dentre as leishmanioses. Causada pela *Leishmania infantum chagasi*, é uma antroponose sistêmica, crônica, potencialmente fatal, e de grande diversidade clínica (WHO, 2015). Alterações na atividade de células T e B provocando a gênese de imunocomplexos circulantes, motiva desordens em diversos órgãos (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NOLI, 1999). Sua forma crônica se apresenta com maior frequência do que a aguda (KOUTINAS et al., 1999). *Leishmania (Leishmania) donovani* é o agente etiológico encontrado na África e Ásia; *Leishmania (Leishmania) infantum*, na Ásia, Europa e África; e *Leishmania (Leishmania) chagasi* encontrada nas Américas (CUNHA; CHAGAS, 1937). Atualmente, é consenso considerar *L. infantum* e *L. chagasi* como uma única

espécie (MAURICIO et al., 2000), sendo no Brasil este principal agente etiológico da LV (WILSON et al., 2005).

1.1.2 Leishmaniose Visceral Canina

O cão, considerado o principal reservatório no ciclo de transmissão na LVC, é considerado como sentinela da infecção em humanos (PRADO et al., 2011 FRAGA et al., 2012). Considerada endêmica em cerca de 50 países, destacando as regiões Sul e Mediterrânea (BANETH et al., 2008). No Brasil, a LVC chega ter prevalência com variação de 1.9 a 35% em áreas endêmicas (BARATA et al., 2013). A presença de formas amastigotas de *Leishmania* em macrófagos juntamente com a reação inflamatória granulomatosa é considerada a lesão histopatológica típica nos tecidos por LVC (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008). Pode apresentar uma variedade de sintomas que variam de hígidez a estágios terminais (FERRER,1999). Alterações como dermatológicas, renais, hepáticas, respiratórias, cardiovasculares, locomotoras, neurológicas, osteoarticulares e oculares podem ser observadas (BLAVIER et al., 2001; CIARAMELLA; CORONA, 2003; ALVAR et al., 2004).

1.1.3 Lesões Oculares na Leishmaniose Visceral

Segundo MOLLEDA et al (1993), PEÑA et al (2000), BRITO et al (2004) e BRITO (2006); o segmento anterior do olho dos animais infectados pelas leishmanias é o mais afetado nas lesões oculares. Destacando-se as blefarites, ceratites, lesões conjuntivais e uveítes. São manifestações uni ou bilaterais, podendo muitas vezes ocorrer mais de uma alteração em ambos os olhos (PEÑA et al., 2000; BRITO et al., 2006).

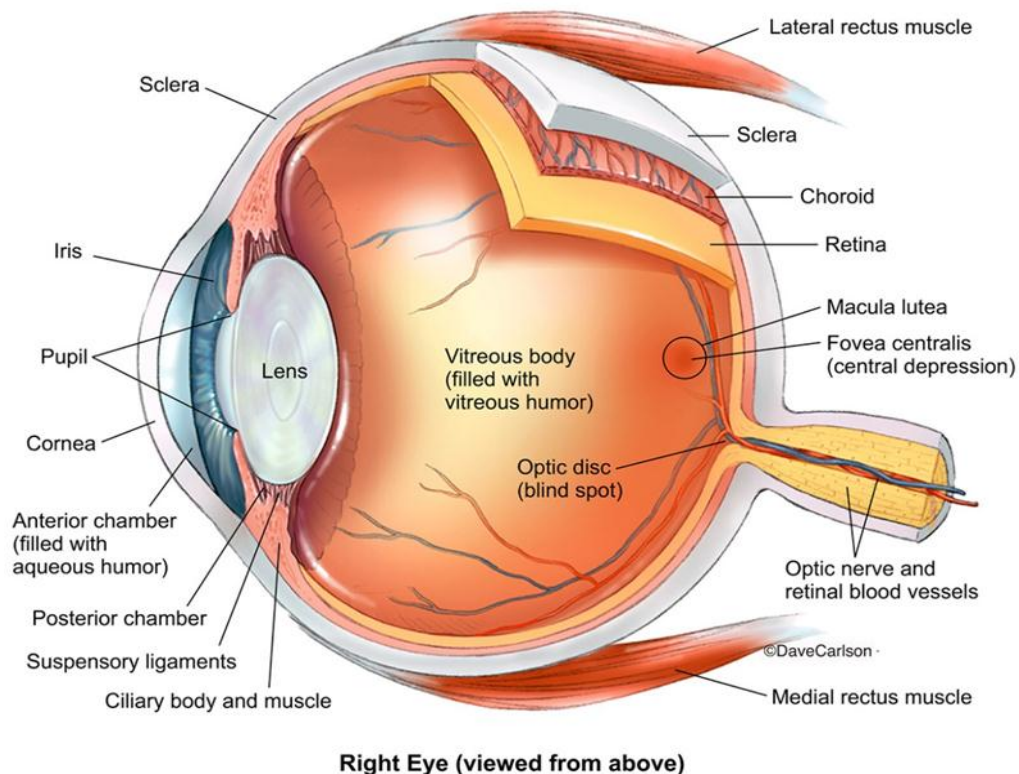
A incidência dessas lesões é devido a dois possíveis fatores: parasitismo direto (migração do parasito de outras áreas de infecção para o globo ocular),ou mecanismos imunomediados (KOUTINAS et al 1999). A úvea e a conjuntiva são importantes membranas dos olhos, onde pode ocorrer deposição de imunocomplexos nas paredes dos vasos (GARCIA-ALONSO et al.,1996). A quebra da barreira hemato-ocular e a passagem de macrófagos parasitados para câmara anterior é a causa dessas manifestações clínicas oculares (PEÑA et al., 2008).

Outras oftalmopatias incomuns, mas não menos importantes em cães com LVC incluem: catarata, glaucoma, ceratoconjutivite seca e deslocamento de retina. Essas manifestações, quando analisadas histologicamente, apresentam infiltrado inflamatório granulomatoso com a presença de formas amastigotas de *leishmania* em macrófagos em algumas estruturas oculares (GARCIA-ALONSO et al., 1996).

Entre as estruturas que fazem parte da anatomia ocular, principalmente do seguimento anterior do olho; temos a córnea, que se caracteriza pela transparência devido a ausência de vasos sanguíneos e pigmentos. É revestida por um epitélio não queratinizado, e constituída uma matriz rica em colágeno organizado que elimina a dispersão da luz por interferência destrutiva (SLATTER E DIETRICH, 2007). A esclera, que compõe a maior parte da túnica externa do olho, funciona como proteção mecânica e manutenção da estrutura ocular. A camada intermediária entre a córnea e a esclera e a camada nervosa (retina), denomina-se úvea e é extremamente vascularizada e dividida em íris, coroide e corpo ciliar. A íris permite a entrada de luz no globo ocular, os espaços entre ela e a córnea e o cristalino, são denominados câmaras (anterior e posterior), ambos preenchidos por humor aquoso, (Figura 2). O corpo ciliar têm principal função a produção do humor aquoso (CHALCATANA, 2011).

A coroide encontra-se na parte posterior da camada vascular, participando da nutrição das demais camadas, absorção da luz e também na produção do humor aquoso. Há ainda o cristalino, responsável pela refração de luz; corpo vítreo, delimitado pelo cristalino, nervo óptico e retina, preenchido pelo humor vítreo. A retina caracteriza-se por uma estrutura nervosa posterior do olho, capaz de transformar impulsos luminosos em impulsos nervosos (CHALCATANA, 2011).

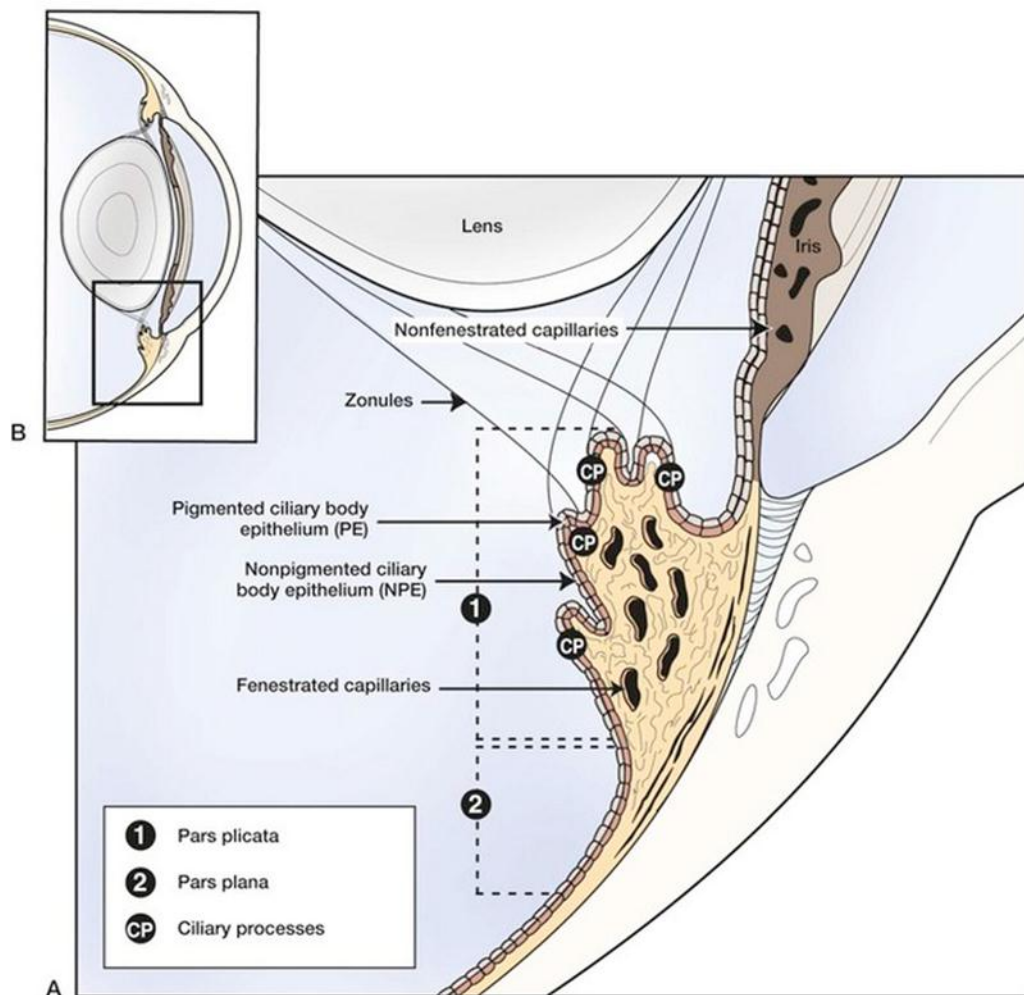
Figura 1- Principais estruturas anatômicas do globo ocular



Fonte: (<https://www.carlsonstockart.com/photo/human-eye-anatomy-illustration-1/>)

O globo ocular possui barreiras que isolam o meio intraocular do sangue e são elas as barreiras hematoaquosa e a barreira hematoretiniana. As barreiras protegem o olho da entrada de substâncias tóxicas e mantém o controle homeostático que sustenta a fisiologia ocular (MUH-SHY et al., 2008). A barreira hematoaquosa é formada pelo epitélio não pigmentado do corpo ciliar, epitélio da íris posterior, endotélio dos vasos da íris com junções ocludentes do tipo frouxo e o endotélio do canal de Schlemm. A barreira hematoretiniana consiste no epitélio pigmentar da retina (barreira externa) e na membrana endotelial dos vasos da retina (barreira interna), ambos com junções ocludentes do tipo não frouxo. As duas barreiras funcionais restringem o movimento de elementos sanguíneos para as câmaras intra-oculares (SMITH E RUDT., 1975). A barreira hemato-aquosa (Figura 2) é composta por segmentos do epitélio não pigmentado, processos ciliares, pelo endotélio da parede interna e pelo ângulo irido-corneal, através da vascularização da íris e dos sistemas de transporte ativo para o exterior do corpo ciliar (MACKNIGHT et al., 2000).

Figura 2 – Ilustração dos componentes da Barreira hemato-aquosa: A barreira hemato-aquosa é localizada no corpo ciliar (CP) e composta por segmentos do epitélio não pigmentado (NPE), epitélio pigmentado (PE), capilares fenestrados e pelos capilares não fenestrados da parede interna.



Fonte: (<https://veteriankey.com/equine-recurrent-uveitis-2/>).

1.1.4 Leishmaniose Visceral e Alterações no Humor Aquoso

Existem poucos relatos que envolvem alterações no humor aquoso, de animais infectados por leishmania (GARCIA ALONSO et al., 1998). A permeabilidade da barreira ocular pode ser alterada, modificando os níveis de concentração proteínicas, uma vez que a detecção de anticorpos e a dosagem das mesmas podem ser um método útil para detectar as principais afecções oculares e o parasito na LVC (DERNOUCHAMPS et al., 1977).

Há estudos sobre anticorpos no humor aquoso com objetivo de esclarecer a patogenia da infecção por *Leishmania* sp. Em um teste de ELISA, BRITO (2006) utilizando peptídeo recombinante S7, detectou anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, no humor aquoso de cães infectados naturalmente. A PCR utilizada recentemente possibilitou identificar e ampliar, seletivamente, o DNA do cinetoplasto (KOUTINAS et al., 1999; ALVES E BEVILACQUA, 2004). A detecção de imunoglobulinas no soro e no humor aquoso de cães infectados por *Leishmania spp.* está sendo utilizada por técnicas de Imunodifusão Radial Simples e Imunofluorescência Indireta, (STRAUSS-AYALI E BANETH, 2001). Destaca-se a imunoglobulina G como a principal imunoglobulina das secreções internas (líquido amniótico, líquor, humor aquoso, líquido peritoneal) (GARCIAALONSO et al., 1995).

O globo ocular possui barreiras que isolam o meio intraocular do sangue e são elas as barreiras hematoaquosa e a barreira hematoretiniana. As barreiras protegem o olho da entrada de substâncias tóxicas e mantém o controle homeostático que sustenta a fisiologia ocular (MUH-SHY et al., 2008). A barreira hematoaquosa é formada pelo epitélio não pigmentado do corpo ciliar, epitélio da íris posterior, endotélio dos vasos da íris com junções ocludentes do tipo frouxo e o endotélio do canal de Schlemm. A barreira hematoretiniana consiste no epitélio pigmentar da retina (barreira externa) e na membrana endotelial dos vasos da retina (barreira interna), ambos com junções ocludentes do tipo não frouxo. As duas barreiras funcionais restringem o movimento de elementos sanguíneos para as câmaras intra-oculares (SMITH E RUDT., 1975). A barreira hemato-aquosa é composta por segmentos do epitélio não pigmentado, processos ciliares, pelo endotélio da parede interna e pelo ângulo irido-corneal, através da vascularização da íris e dos sistemas de transporte ativo para o exterior do corpo ciliar (MACKNIGHT et al., 2000).

O humor aquoso (HA) é um líquido claro que preenche e ajuda a formar as câmaras anterior e posterior do olho. A lente e a córnea devem permanecer transparentes para permitir a transmissão de luz e, portanto, não podem ser vascularizadas. É análogo a um substituto sanguíneo para essas estruturas avasculares e fornece nutrição, remove produtos excretórios do metabolismo, transporta neurotransmissores, estabiliza a estrutura ocular e contribui para a regulação da homeostase desses tecidos oculares, também permite que células

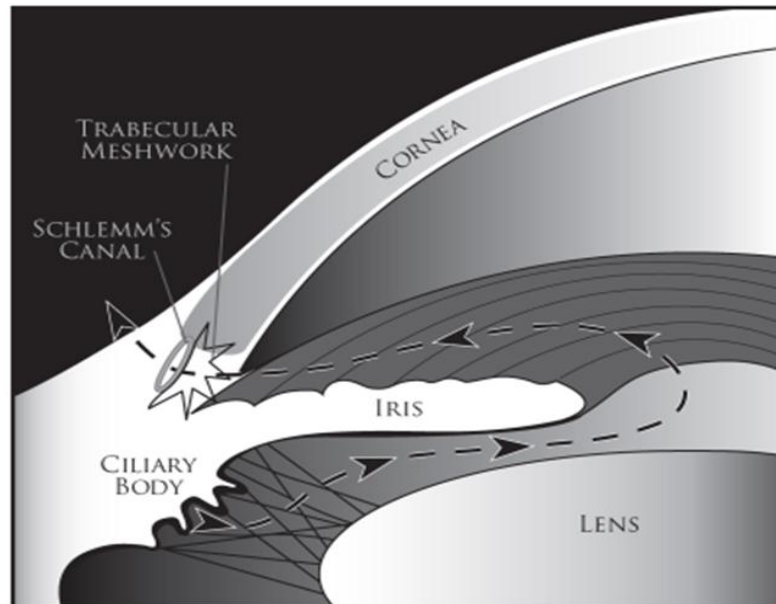
inflamatórias e mediadores circulem no olho em condições patológicas, bem como a distribuição de medicamentos a diferentes estruturas oculares (MANIK et al., 2010)

O humor aquoso (HA) sai do olho por fluxo passivo, através de duas vias no ângulo da câmara anterior, localizado anatomicamente no limbo (A via convencional consiste em humor aquoso que passa através da rede trabecular, através da parede interna do canal de Schlemm, (Figura 3) em seu lúmen e em canais coletores de drenagem, veias aquosas e veias episclerais (ASCHER, 1954). Nos cães e nos seres humanos, a drenagem é realizada principalmente por meio do ângulo irido-corneal (VAN DER WOERDT et al., 1995), (Figura 4). O HA é formado a partir do sangue por três mecanismos: difusão, ultrafiltração e secreção ativa pelo epitélio do corpo ciliar (GUM e MACKAY, 2013). A sua baixa viscosidade decorre principalmente da grande quantidade de água (99,6%) e do baixo teor proteico (GOEL et al.,2010; GABELT E KAUFMAN, 2011).

Por ser o humor aquoso um ultrafiltrado do plasma, sua composição assemelha-se a ele, com algumas exceções notáveis, como baixa concentração proteica, quantidades reduzidas de glicose, ureia e nitrogênio não proteico e elevada concentração de ascorbato e lactato (GABELT E KAUFMAN, 2011; GILGER E DEEG, 2011). O teor de proteínas do humor aquoso apresenta diferenças quantitativas e qualitativas em comparação com o plasma. A maioria das proteínas do humor aquoso são glicoproteínas intrínsecas do vítreo, que são produtos secretores da camada epitelial interna do corpo ciliar (HADDAD et al., 1991).

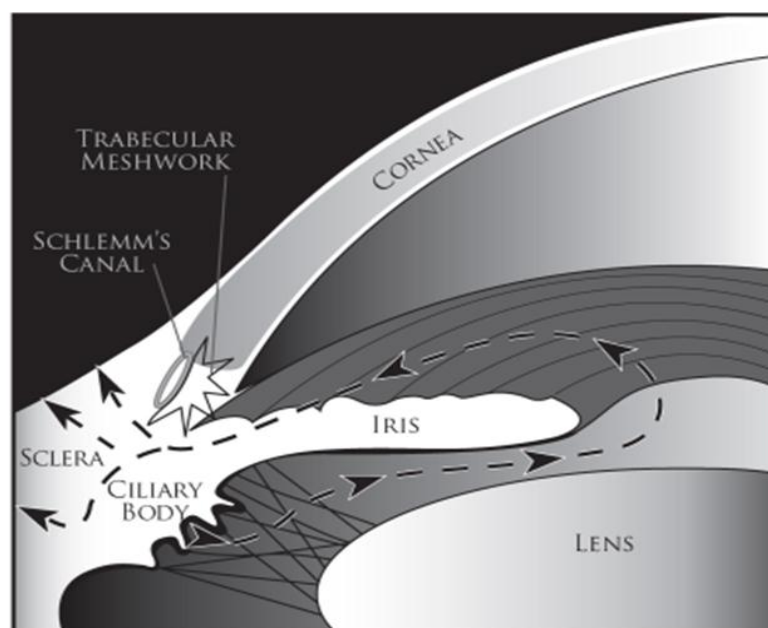
O aumento de proteínas e de células no HA pode ser desencadeado pela desestabilização da barreira hematoaquosa (BHA). Pode decorrer de uveítes, intervenções cirúrgicas ou paracentese (ALBAUGH et al., 2011).Em lesões como as uveítes, a concentração de proteína no humor aquoso aumenta acima do seu valor normal (normalmente em torno de 20 mg/100 mL), há dispersão da luz, ocorrendo um fenômeno denominado turbidez, uma vez que a luz passa pela câmara anterior (KAUFMAN E ALM, 2004).

Figura 3 - Principais estruturas oculares responsáveis pela formação do humor aquoso. Diagrama esquemático ilustrando a malha trabecular via de saída convencional. O humor aquoso é produzido pelo corpo ciliar e flui (linha tracejada mostrada com setas) da câmara posterior através da pupila para a câmara anterior. De lá, ele flui através da rede trabecular para dentro do Canal de Schlemm e, posteriormente é absorvido pela episclerol veia, através dos canais coletores.



Fonte: GOEL et al., 2010.

Figura 4 - Diagrama esquemático ilustrando a vazão uveoscleral. O humor aquoso é produzido pelo corpo ciliar, em rota uveoscleral, flui da câmara posterior até a pupila na câmara anterior e, em seguida (mostrado por linhas tracejadas e pontas de flecha) através da face do corpo ciliar e raiz da íris para o músculo ciliar e o espaço supracoroidiano de ambas as veias coróide e esclera ou através dos poros esclerais ao tecido episcleral.



Fonte: GOEL et al., 2010

1.1.5 Leishmaniose Visceral e Alterações de Proteínas

A albumina é uma das mais importantes moléculas presentes no plasma, responsável por manter a pressão coloidosmótica, tendo um baixo peso molecular e alta concentração (DOWEIKO E NEMPLEGGI 1991). Na grande maioria dos cães infectados por *Leishmania infantum*, ocorre proteinúria decorrente de lesão glomerular (BONFANTI E ZATELLI 2004), e a produção de anticorpos caracteriza hipergamaglobuliemia (FERRER 1999, AMUSATEGUI et al., 2003, ALVAR et al., 2004). A diminuição de albumina (hipoalbumemia) devido a nefropatia, doença hepática e subnutrição crônica (AMUSATEGUI et al., 2003; BONFANTI E ZATELLI 2004).

1.1.6 Leishmaniose Visceral e Metaloproteinases da Matriz

Enzimas capazes de digerir proteínas da membrana basal (MB) que participam da remodelação da matriz extracelular (MEC), denominadas collagenases foram descritas pela primeira vez por GROSS e LAPIERE (1962) por meio da observação em géis, de extratos da cauda involutiva de girinos, e foram denominadas collagenases (PARKS E MECHAM, 1998). O relato da presença de metaloproteinases da matriz no olho ocorreu pouco tempo após a sua descoberta e, foi feito por SLANSKY, FREEMAN e ITOI em córneas bovinas saudáveis e ulceradas (SLANSKY et al ; 1968).

As metaloproteinases são endopeptidases zinco-dependentes ou proteases endógenas da matriz extracelular (MEC), que são capazes de participar de funções da MEC, através da modulação de seus componentes por hidrólise, controle dos sinais suscitados por suas moléculas, que regulam a proliferação, diferenciação e morte celular, desta forma regulando a integridade e estrutura da matriz (MANDAL et al., 2003). Estão organizadas em quatro principais classes de acordo com o substrato que degradam, gelatinases A e B, MMP-2 e MMP-9 devido à sua capacidade de degradar gelatina (ROSEMBERG, 2002).

Segundo NAGASE et al. (2006) e BONNANS et al. (2014), foram identificadas 23 MMPs em humanos e existem enzimas homólogas em outras espécies; como a canina. São formadas em geral por uma sequência sinalizadora N-

terminal (pré-domínio) que chega ao retículo endoplasmático onde é removida. Para manter a latência da enzima forma-se um domínio pró-peptídico, um domínio catalítico contendo um sítio de ligação do íon zinco (Zn^{2+}); uma região de articulação ou ligação e um domínio de repetições que coincidem à hemopexina (STERNLICHT E WERB, 2001). As MMPs em grande maioria são ativadas no exterior da célula, muitas vezes por outras MMPs já ativadas (STERNLICHT E WERB, 2001). Sua atividade é controlada pela ação de inibidores endógenos presentes no plasma, como $\alpha 2$ -macroglobulina e trombospondina-1 e 2, e inibidores teciduais de metaloproteinases, as TIMPs - Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), e a proteína RECK (Reversion-Inducing Cysteine Rich Protein with Kazal Motifs), ligada à membrana, capaz de regular negativamente MMP-2, 9 e 14 (FURUMOT et al., 2001; OH et al., 2001; DONG et al., 2010). EGEBLAD E WERB (2002) e NAGASE et al. (2006) descreveram quatro classes de TIMPs (1,2,3,4), capazes de inibir diversas MMPs. Segundo SHULZ (2007), há uma preferência ligação do TIMP-2 pela MMP-2 e do TIMP-1 pela MMP-9.

Alguns trabalhos realizados com cães com LV descrevem a presença de algumas destas enzimas em suas formas inativas e ativas. As lesões inflamatórias multi-sistêmicas observadas na LV estão associadas com um aumento das MMPs séricas, especialmente da MMP-9 (MARANGONI et al., 2011). MMP-9 é elevada no líquido de cães com LV. Embora estes resultados sejam preliminares, eles sugerem que a MMP-9 pode ter um papel no rompimento da barreira hematoencefálica (MELO et al 2011). Nas lesões cutâneas de cães com LV, JACINTHO et al. (2018) concluíram que quanto maior a carga parasitária e a intensidade de inflamação na pele, maior a degradação do colágeno maduro, e a produção de MMPs 2 e 9.

As enzimas da matriz existentes na córnea são as MMPs e as serinoproteases. A serinoprotease mais abundante na lágrima humana, canina e equina é a neutrófilo elastase (NE), que é produzida por leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. As MMPs 2 e 9 participam na degradação e remodelação estromal; a MMP-2 é produzida por ceratócitos e tem a função de manutenção da córnea saudável, sendo localmente ativada para degradar moléculas de colágeno danificadas, enquanto a MMP-9 é produzida por células epiteliais e polimorfonucleares após lesões corneais (GILGER et al., 2007). Enquanto a MMP-2 foi encontrada em córneas saudáveis de humanos, cães e camundongos, ratos e cavalos (GILGER et al; 2007) em córneas com lesão foram detectadas MMP-2 e

MMP-9 no epitélio, em toda a extensão do estroma e no endotélio dos vasos (OLLIVIER et al; 1996), (Figura 1); e no epitélio e estroma de córneas caninas com úlceras em “melting” (ceratomalácea) e traumáticas (KALLBERG et al ; 2004).

Até o presente momento não foram encontradas referencias na literatura sobre a participação de MMPs em lesões inflamatórias no globo ocular de cães com leishmaniose, e a sua possível participação na alteração da permeabilidade das barreiras oculares, sendo este o objetivo deste trabalho. A hipótese deste estudo é que a ativação de MMPs pode estar envolvida na alteração da permeabilidade das barreiras oculares.

Figura 5 - Esquema destacando o efeito das MMPs na degradação das proteínas da matriz extracelular do globo ocular, como tem sido observado em casos de lesões oculares (ex. degeneração macular, glaucoma, retinopatia do diabetes)

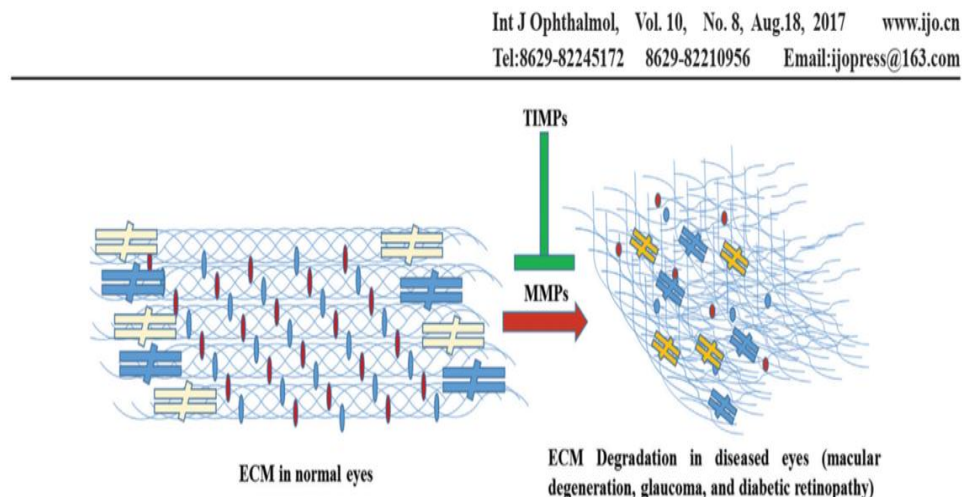


Figure 1 A simple schematic highlighting the effects of MMPs on ocular ECM metabolism. During disease conditions the homeostatic balance between MMPs and TIMPs gets disturbed leading to degradation of ECM normal architecture in the eyes of the affected patients.

Fonte: BREJCHOVA et al .2009

2 CAPÍTULO 1- INVESTIGAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS BARREIRAS OCULARES, DA PRESENÇA DE PRO-MMP-2, MMP-2, PRO-MMP-9, MMP-9, DOSAGEM DE PROTEÍNAS NO HUMOR AQUOSO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR LEISHMANIA INFANTUM.

2.1 Resumo

A leishmaniose visceral (LV) é uma antroponose sistêmica de evolução crônica, causada pela *Leishmania infantum*, de distribuição mundial, acometendo cães e humanos no ambiente urbano. Nos cães, são observados sinais clínicos frequentes tais como emagrecimento e linfadenomegalia; e existem sinais clínicos menos estudados como as alterações inflamatórias no globo ocular. A hipótese deste estudo é que a ativação de MMPs pode estar envolvida na alteração da permeabilidade das barreiras oculares. Para verificar isto a presença e/ou ativação das metaloproteinases (MMP) 2 e 9, foram quantificadas por meio de zimografia do humor aquoso de 28 cães com LVC e 4 cães do grupo controle. A presença de Pro-MMP-2 foi detectada no humor aquoso de 27 animais do grupo infectado (27/28 cães) e também no grupo controle, sem diferir estatisticamente. A MMP-2 foi detectada no humor aquoso de um animal infectado. Já Pro-MMP-9 (10/28) e/ou sua forma ativa, (11/28) foram observadas em animais infectados e não no grupo controle. Para verificar se a presença das MMPs ativas poderia interferir com a integridade das barreiras oculares em cães com LVC, foi quantificada a presença de proteínas totais no soro e no humor aquoso destes cães. A quantificação de proteínas totais, albumina e globulinas no soro foram semelhantes aos valores citados na literatura no soro de animais com LV. No humor aquoso os valores individuais de proteína total, determinados pelo método Microprot apresentaram variação individual muito grande nos dois grupos, e também não foi observada diferença estatística entre os mesmos. A presença de Pro-MMP-2 em animais do grupo controle comprova a produção constitutiva desta MMP, entretanto, a ausência da forma ativa da MMP-2 nos grupos controle e infectado sugere a não ativação ou inativação eficiente das mesmas por TIMPS. As formas ativas e inativas da MMP-9 foram detectadas apenas no humor aquoso de cães infectados. A albumina, embora seja um marcador utilizado para aferir a permeabilidade das barreiras oculares não se apresentou como um parâmetro efetivo neste experimento devido as limitações do método de detecção utilizado.

Palavras chave: Metaloproteinases. Proteínas. Doenças Inflamatórias dos Olhos. Aparelho Lacrimal.

2.2 Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is a systemic anthroponosis of chronic evolution, caused by *Leishmania infantum*, worldwide, affecting dogs and humans in the urban environment. In dogs, frequent clinical signs such as weight loss and lymphadenomegaly are observed; and there are less studied clinical signs such as inflammatory changes in the eyeball. The hypothesis of this study is that the activation of MMPs may be involved in altering the permeability of eye barriers. To verify this the presence and / or activation of metalloproteinases (MMP) 2 and 9 were quantified by aqueous humor zymography of 28 dogs with CVL and 4 dogs of the control group. The presence of Pro-MMP-2 was detected in the aqueous humor of 27 animals of the infected group (27/28 dogs) and also in the control group, without statistically differing. MMP-2 was detected in the aqueous humor of an infected animal. Pro-MMP-9 (10/28) and / or its active form (11/28) were observed in infected animals and not in the control group. To verify whether the presence of active MMPs could interfere with the integrity of eye barriers in dogs with CVL, the presence of total proteins in serum and aqueous humor of these dogs was quantified. The quantification of serum total proteins, albumin and globulins were similar to those reported in the literature of serum from animals with VL. In aqueous humor the individual values of total protein determined by the Microprot method showed very large individual variation in both groups, and no statistical difference was observed between them. The presence of Pro-MMP-2 in control group animals proves the constitutive production of this MMP, however, the absence of active form of MMP-2 in the control and infected groups suggests their non-activation or efficient inactivation by TIMPS. Active and inactive forms of MMP-9 were detected only in the aqueous humor of infected dogs. Although albumin is a marker used to measure eye barrier permeability, it was not an effective parameter in this experiment due to the limitations of the detection method used.

Keywords: Metalloproteases. Proteins Inflammatory Eye Diseases. Lacrimal apparatus.

2.3 Introdução

Os cães, além de serem os principais reservatórios do ciclo de transmissão da LV, contribuem para persistência do parasita nas zonas urbanas e podem ser considerados animais sentinelas da infecção em humanos (FRAGA et al., 2012; PRADO et al., 2011). No cão, os principais sinais clínicos decorrentes de infecção por *L. infantum* são onicogribose, lesões cutâneas, conjuntivite, linfadenopatia, e perda de peso entre outros. Lesões inflamatórias perioculares e oculares como blefarites, ceratopatias e uveítes são frequentes (GARCIA-ALONSO et al., 1996). A leishmaniose visceral em sua forma crônica desencadeia uma enfermidade ocular característica denominada Leishmaniose Ocular Canina (LOC), com própria resposta imune ao parasita (GARCIA-ALONSO et al., 1998). O parasitismo da LV pode ser observado na conjuntiva ocular, limbo, corpo ciliar, íris, córnea, esclera e ângulo irido-corneal dos animais infectados (KOUTINAS et al., 1999). Na literatura atribui-se estas lesões oculares à atividade exagerada de linfócitos B formando imunocomplexos nas paredes dos vasos sanguíneos dos órgãos (NOLI, 1999), favorecendo o aparecimento de vasculites e uveítes (GARCIA-ALONSO et al., 1996). O segmento anterior ocular é o mais afetado (MOLLEDA et al., 1993).

O humor aquoso formado no corpo ciliar, preenche a câmara posterior, orifício pupilar e a câmara anterior do olho, onde é drenado; trata-se de um fluido transparente cujas funções incluem oferecer nutrientes para córnea e o cristalino, remover metabólitos, transportar neurotransmissores, e estabilizar o funcionamento normal do olho e manter a pressão intraocular constante (MILLER, 2008; GOEL et al., 2010; GUM e MACKAY, 2013; DAVIS et al., 2015). O humor aquoso pode desempenhar um papel importante em doenças como na LV (NOVAIS et al., 1986). A detecção de anticorpos e a dosagem dos níveis de proteínas revelam um método útil no diagnóstico de afecções oculares e detectar a presença do parasito (HAZEL et al., 1985; GARCIA ALONSO et al., 1996). Como a integridade das barreiras oculares pode ser quebrada, a alteração na composição do humor aquoso pode ser revelada pela alteração na concentração de proteínas (DERNOUCHAMPS et al., 1977). À medida que aumenta o processo inflamatório, as concentrações proteicas são proporcionais, tornando aparentemente próximas as frações desse líquido com o plasma (BLOGG ; COLES, 1971).

As metaloproteinases da matrix (MMPs) são proteases endógenas divididas em collagenases, gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromalisinas e as com especificidade para membranas celulares (COUTURE et al., 2006; OLLIVIER et al., 2007). Elas são essenciais na destruição de tecidos, reparação e remodelação dos mesmos. Nos olhos, a MMP-2 encontra-se presente em sua forma inativa e constitutiva em córneas normais e possui como função a degradação de fibras colágenas ocasionalmente danificadas. A MMP-9 encontra-se presente após danos corneais, induzindo à destruição de estruturas adesivas da membrana basal das células epiteliais, retardando, por conseguinte, a reepitelização corneal (OLLIVIER et al., 2003; BOVELAND et al., 2010). Essas MMPs são inativadas por inibidores teciduais de metaloproteinases, específicos e endógenos, constituindo uma família de 4 inibidores de protease: TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4. Em córneas ulceradas, como as humanas, a atividade das proteinases encontra-se significativamente aumentada no filme lacrimal pré-corneal (STRUBBE et al., 2000; OLLIVIER et al., 2004). Essas enzimas se destacam pela participação em processos degenerativos do globo ocular associadas a diabetes e glaucoma, como em outras afecções. Assim, a desregulação funcional como acompanhada pela ativação excessiva de MMPs tem sido associada a muitas doenças humanas (NAGASE, 2002; STAMENKOVIC; ITOH, 2003). Como em outros órgãos, as MMPs também são responsáveis pela manutenção e remodelação da arquitetura ocular, influenciando uma ampla gama de processos nos mesmos (DANIELS et al., 2003). Até o presente momento não foram encontradas referências na literatura sobre a participação de MMPs em lesões inflamatórias no globo ocular de cães com leishmaniose, e a sua possível participação na alteração da permeabilidade das barreiras oculares, sendo este o objetivo deste trabalho. A hipótese deste estudo é que a ativação de MMPs pode estar envolvida na alteração da permeabilidade das barreiras oculares.

2.4 Materiais e Métodos

2.4.1 Animais

Neste estudo, os cães utilizados foram provenientes do serviço de atendimento do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba / UNESP ou do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba/SP. Os animais foram submetidos à eutanásia conforme a Lei n ° 8050/18 vigente até o

momento - Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

2.4.2 Ética

Todos os procedimentos e métodos utilizados no estudo estão sob ciência e de acordo com a Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEEA da FMVA, UNESP, Araçatuba/SP. Protocolo FOA 01084-2015.

2.4.3 Delineamento Experimental

A pesquisa de anticorpos para leishmaniose foi realizada por meio do Teste ELISA indireto (LIMA et al., 2003); além do exame citológico do linfonodo poplíteo, baço e medula óssea para comprovação da infecção. Foram considerados positivos os animais com DO maior que 0,274. Para este estudo foram selecionados 28 cães sorologicamente positivos para LVC apresentando um ou mais sinais clínicos característicos da doença (ex. emagrecimento, alopecia, dermatite, onicogribose, linfadenomegalia), independente de apresentarem alterações oculares evidentes ao exame macroscópico, para compor o grupo de animais infectados. O grupo controle composto por quatro animais com sorologia (ELISA) e exame citológico negativos, e sem alterações oculares. Foram também realizados testes sorológicos para excluir animais com Toxoplasmose, Neosporose e Erliquiose.

Todos os animais também foram submetidos a avaliação bioquímica do soro para verificar os níveis de albumina e proteínas totais utilizando-se os kits da Labtest Diagnostica®. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. O cálculo da concentração da globulina foi feito extraíndo-se o valor da albumina do valor da proteína total. Os valores de referencia para Proteína Total no soro foram de 5,5-8,0 g/dL (KANEKO, 1997; MEYER E HARVEY, 2004); os da albumina 2,6-3,3g/dL e da globulina 2,5-4,5g/dL (KANEKO, 1997; MEYER E HARVEY, 2004).

2.4.4 Colheita do material

Para realização do hemograma, foram colhidas amostras de sangue (1mL) da veia jugular, em tubos com EDTA. Para o perfil bioquímico e ELISA, as amostras colhidas foram de 10 mL sem anticoagulante para obtenção do soro. As amostras foram centrifugadas (10 x g por 10 minutos) e o soro obtido foi imediatamente separado em alíquotas de 3 mL armazenadas a -20°C.

Para a eutanásia dos animais, foi administrada uma superdosagem de tiopental por via intravenosa, associada à administração de cloreto de potássio 19% em dose letal. Procedeu-se sequência o exame necroscópico de rotina para colheita de amostras de tecidos oculares. De forma aleatória, de um dos olhos foi colhida amostra do humor aquoso através de punção na junção esclero-corneal, com auxílio de uma seringa de 5mL. Após a colheita do líquido, os volumes variáveis dos mesmos foram separados, centrifugados e armazenados a -20°C. O olho contralateral foi removido íntegro e colocado em solução de formal tamponado 10% (pH 7.4), onde foi mantido por 12 a 24 horas antes de ser processado para a inclusão em parafina e obtenção dos cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina. Foram avaliados os cortes histológicos dos cães com detecção de MMP-9.

2.5 Dosagem de Proteínas totais do humor aquoso

Para verificar a integridade da barreira ocular (hemato-aquosa) foi realizada a dosagem de proteínas totais no humor aquoso. Utilizou-se o método de Microprote Piragalol(Doles®), segundo as recomendações do fabricante. Este método é indicado para a quantificação da fração de proteína composta por albumina e globulina, e possui sensibilidade para detectar 7mg/dL de proteína. Como referencia para os valores de proteína total do humor aquoso foram adotados os valores de Falcão (2008)

2.6 Zimografia

A atividade gelatinolítica das amostras de humor aquoso foi detectada por electroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo IHARA et al. (2001); com modificações. Resumidamente, géis de

poliacrilamida (10%) foram copolimerizados com gelatina (G8150-100G, Sigma-Aldrich). Quantidades iguais de proteína total da amostra (15 mg) foram incubados no tampão da amostra contendo 125mM de Tris-HCl, pH 6,8; 20% (v/v) de glicerol, SDS a 4% (p/v) e azul de bromofenol a 0,2% (p/v), em temperatura não desnaturante (37°). As amostras foram então submetidas a eletroforese a 4°C por 3 horas. Os géis foram lavados em Triton X-100 a 2,5% (v / v) por 30 minutos para remover o SDS e foram então incubados á mesma temperatura não desnaturante. Com o tampão de ativação enzimática consistindo em 50 mM de Tris, 200 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ e 0,2% (p / v) de Brij-35, pH 7,5, por 20h a 37°C sob agitação suave. Após a incubação, os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie a 0,5% (p / v) R-250, metanol a 45% (v/v) e ácido acético glacial a 10% (v/v) por 30 minutos, e então descorados com 45% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ido ácido glacial durante 30 min. A atividade gelatinolítica foi indicada por bandas claras contra o fundo azul escuro. A identificação dos pesos moleculares das MMPs foi determinada utilizando como padrão MMPs extraídas do adenocarcinoma mamário canino, que foram previamente padronizadas com MMP-2 recombinante (PF037, Calbiochem) e MMP-9 (PF038, Calbiochem). Os géis foram digitalizados e as densidades integradas das bandas, expressas como arbitrárias unidades (A.U.), foram calculadas pela soma dos valores de pixel dentro da área digerida da banda e subtraindo a densidade de fundo (atividade de gelatinase = número de pixels × superfície área), usando o software de acesso aberto ImageJ1.41^o, Wayne Rasband, Institutos Nacionais de Saúde;<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

2.7 Análise Estatística

Para comparação entre o grupo controle e o infectado utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitman considerando-se o p valor de < 0,05 como significativo. Foi feito também, o teste de correlação de Spearman ($0,3 \leq \rho < 0,7$) para verificar se existe correlação entre as concentrações de imunoglobulinas no soro e no humor aquoso e entre a concentração de imunoglobulina no humor aquoso e a de Pro-MMP-2 , considerando as correlações moderadas ($r = 0,40$ a $0,69$), fortes ($r = 0,70$ a $0,89$) e muito fortes ($r = 0,90$ a $1,00$).

2.8 Resultados

Os cães selecionados para análise apresentaram anticorpos anti-leishmania no soro diferendo significativamente dos cães do grupo controle (Figura 1A). Foi observada hiperproteinemia em 16 cães do grupo de infectado (Figura 1B). Nas figuras 1C e 1D é possível observar que os cães infectados (23 animais) apresentaram hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos controles com infectados ($p > 0,05$).

Na Figura 2 (A e B) foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e infectado na comparação entre valores da densidade óptica do humor aquoso (DO). Para os valores da proteína total não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Os valores da proteína total dos cães infectados variaram entre 0,26 a 14,38mg/dL.

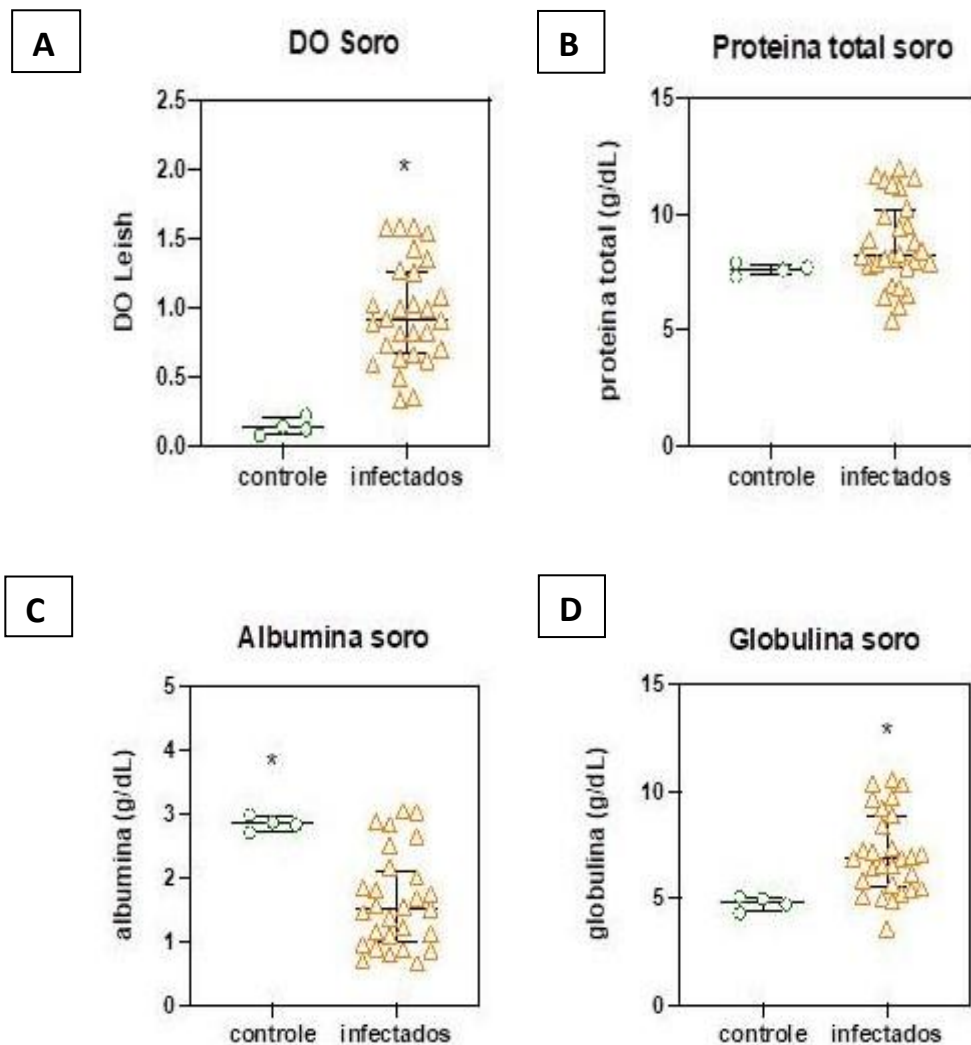
Em relação a detecção das formas ativas e inativas das metaloproteinases 2 e 9 no humor aquoso, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos infectados e controle ($p > 0,05$). A Pro-MMP-2 detectada no humor aquoso dos cães em ambos os grupos (Figura 3A). A MMP-2 foi detectada em um animal infectado (Figura 3B). Quanto a Pro-MMP-9 e a MMP-9 estavam presentes apenas no humor aquoso de animais infectados (Figuras 3 B e D).

Foi verificada a correlação positiva moderada ($0,3 \leq \rho < 0,7$) entre a DO do soro e DO do humor aquoso ($r=0,66$) (Figura 4-A), mas não houve correlação entre a DO do humor aquoso e a detecção de Pro-MMP2 (Figura 4B).

A Figura 5 ilustra algumas alterações inflamatórias observadas no globo ocular de cães onde a MMP-9 foi detectada no humor aquoso. Dos 11 animais onde a forma ativa da MMP-9 foi detectada, sete apresentavam lesões inflamatórias. Observa-se a presença de intensa inflamação composta por células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) com localização principalmente na região de transição esclero-corneal e também em corpo ciliar e perineuro do nervo óptico. Não foram observadas formas amastigotas do parasito em cortes corados por HE.

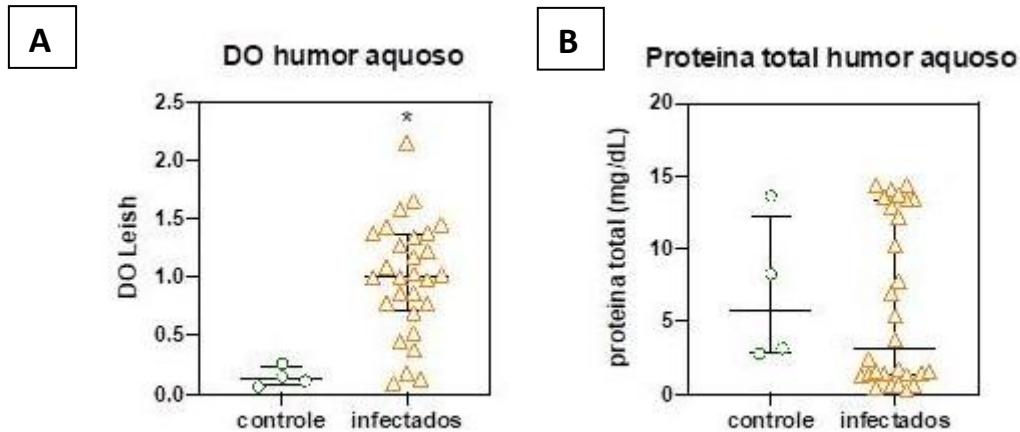
Figura 1- Perfil de proteínas do soro dos cães com leishmaniose e do grupo controle.

Em A – O resultado da sorologia (ELISA) confirma a presença de anticorpos anti-leishmania no soro dos animais infectados. Em B observa-se os valores da proteína total estão mantidos dentro dos parâmetros normais (n=12) e existem 16 cães com valores superiores aos parâmetros normais (hiperproteinemia). Em C e D – Os os cães infectados apresentam em sua maioria hipoalbuminemia (n=23) e hiperglobulinemia no soro (n=27). Teste de Mann-Whitman $p < 0,05$.



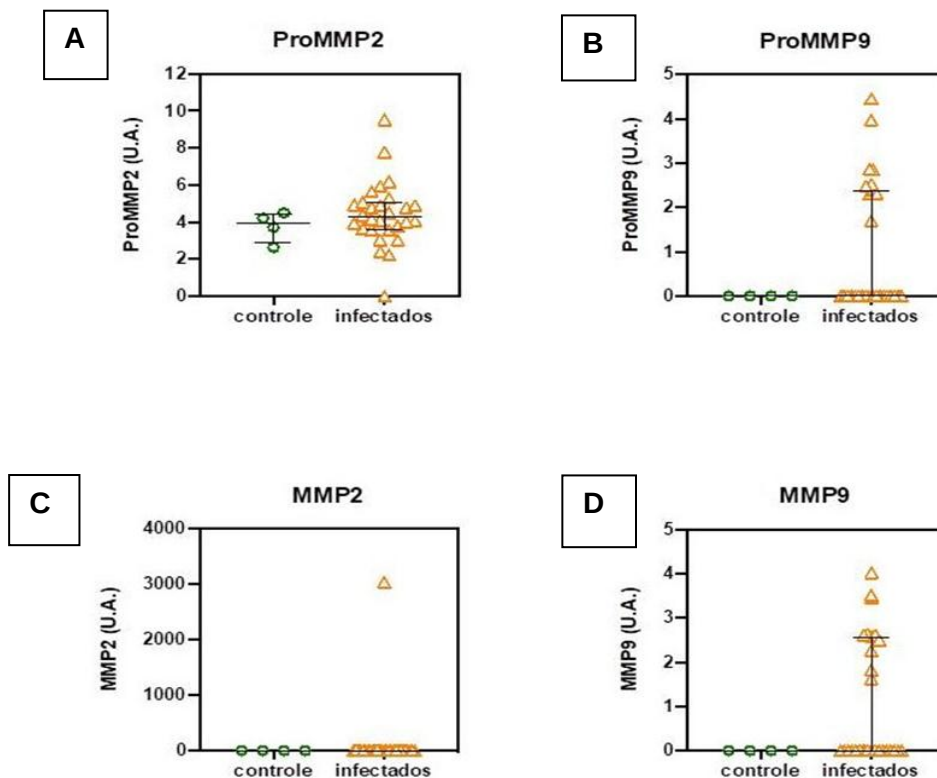
Fonte: Elaborada pela Autora

Figura 2- Valores da densidade óptica (DO) do Humor Aquoso onde observa-se diferença entre na quantidade de IgG anti-leishmania entre os grupos controle e infectado B- Valores da proteína total no humor aquoso dos cães dos grupos controle e infectado, não houve diferença significativa entre os grupos e os valores individuais dos dois grupos são muito variados. Teste de Mann-Whitman $p < 0,05$.



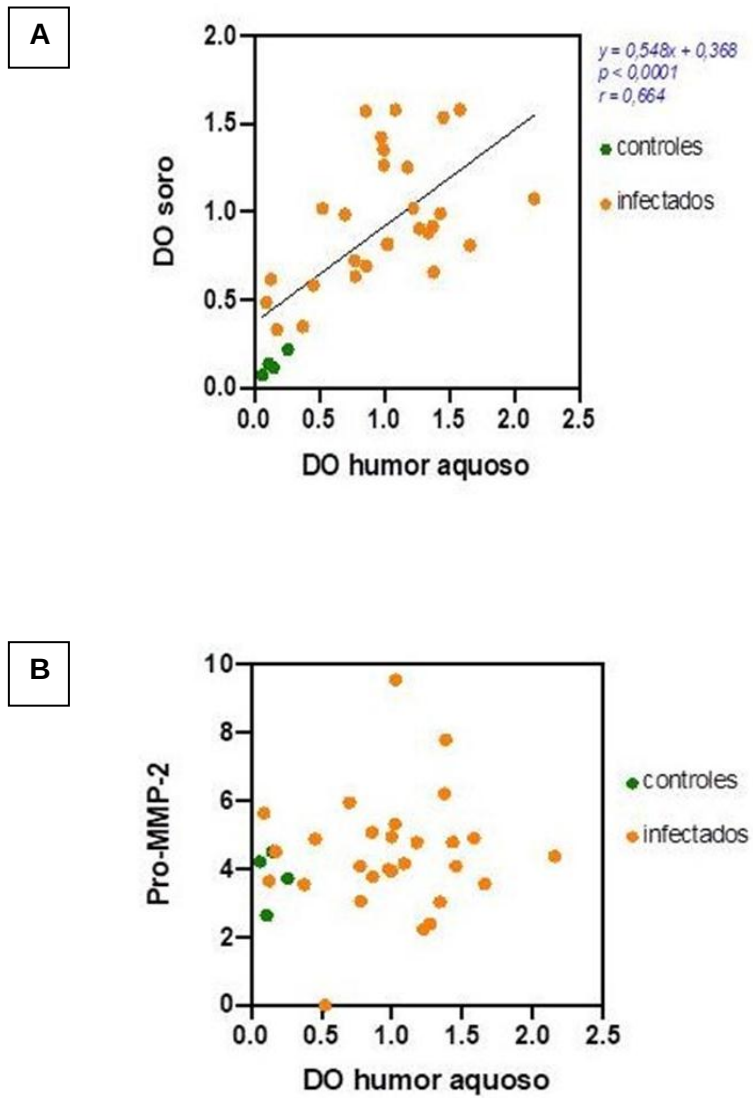
Fonte: Elaborada pela Autora

Figura 3- Detecção das formas inativas e ativas das metaloproteinases 2 e 9 encontradas no humor aquoso de cães com leishmaniose visceral. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e infectados. Observa-se que a Pro-MMP-2 está presente tanto nos animais controle como nos infectado (A) e a MMP-2 (C) foi detectada em apenas um animal infectado. A Pro-MMP-9 e a MMP-9 não foram detectadas em animais do grupo controle, mas estavam presentes em animais infectados (B e D). Considerando $p < 0,005$.



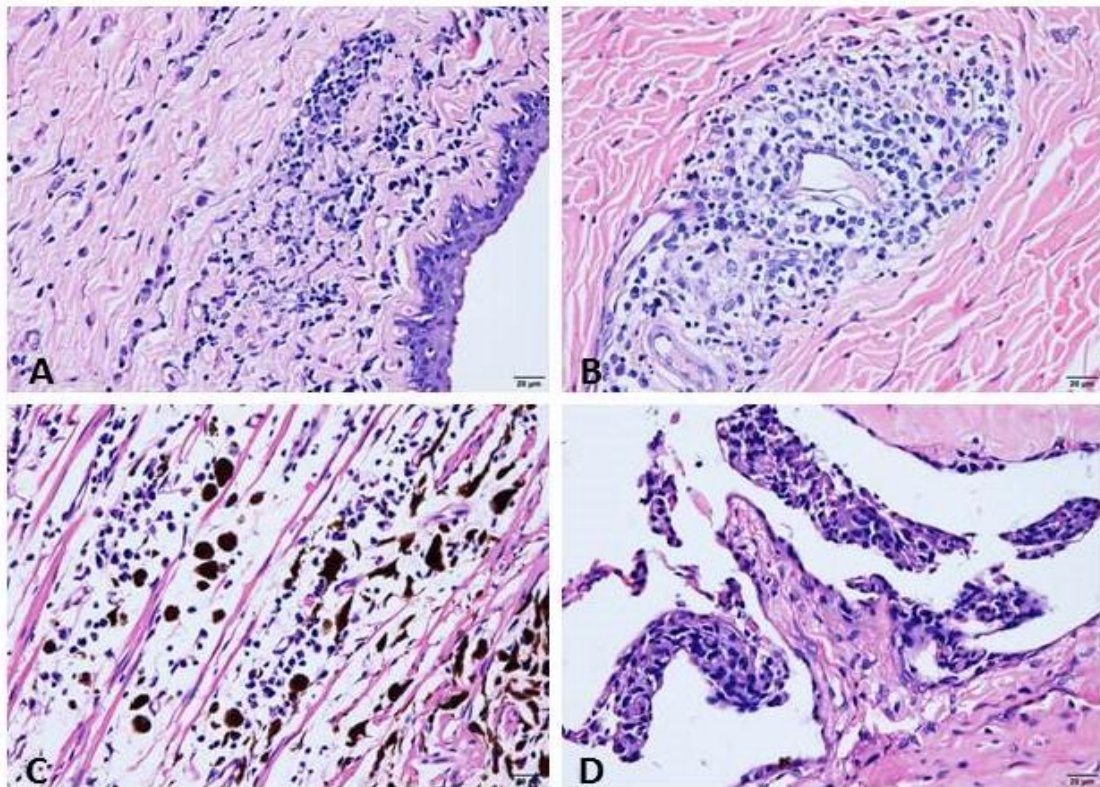
Fonte: Elaborada pela Autora

Figura 4 - Diagrama de dispersão. Observar correlação positiva moderada entre a DO do soro e DO do humor aquoso ($r=0,66$). Observar ausência de correlação entre a Pro-MMP2 detectada no humor aquoso e a DO do humor aquoso. Teste de correlação de Spearman ($0,3 \leq p < 0,7$).



Fonte: Elaborada pela Autora

Figura 5- Fotomicrografias de globo ocular de cão com leishmaniose visceral. A – Infiltrado inflamatório mononuclear com intensidade moderada em região de transição esclero-corneal. B - Infiltrado inflamatório mononuclear com intensidade acentuada perivascular em região de transição esclero-corneal. C - Infiltrado inflamatório mononuclear com intensidade acentuada na região do corpo ciliar. D – Infiltrado inflamatório mononuclear com intensidade em região perineural. (coloração HE, barra = 20µm).



Fonte: Elaborada pela Autora

2.9 Discussão

A pesquisa de anticorpos para *L. infantum* no soro e no humor aquoso confirma a presença dos mesmos nestes dois compartimentos. Barreiras de filtração, notadamente a hemato-ocular, são muito sensíveis. Quando há disfunção da mesma, seja por traumatismos, enfermidades ou efeitos farmacológicos; componentes plasmáticos entram no humor aquoso, aumentando o movimento do conjunta das respostas imune sistêmica e local, incluindo a presença de imunocomplexos na patogenia das lesões oculares que cursam com a LVC. BRITO et al. (2006) confirmaram a produção local de anticorpo anti-leishmania no globo

ocular de cães. A produção de imunoglobulinas não confere proteção aos cães infectados, sendo potencialmente prejudicial, uma vez que elas permanecem circulantes e tendem a se depositar em regiões específicas. Complexos antígeno-anticorpo foram identificados com o uso de imuno-histoquímica, no processo ciliar e na sua inserção com o corpo ciliar (MOLLEDA et al., 1993; GARCIA-ALONSO et al., 1998). Linfócitos B geram grandes quantidades de anticorpos que formam imunocomplexos circulantes na leishmaniose (GOTO E LINDOSO, 2004).

A correlação entre a DO do soro e a DO do humor aquoso foi média, o que difere dos resultados GARCIA-ALONSO (1994) cuja hipótese era de transferência de anticorpos do sangue para o humor aquoso, e encontrou uma correlação forte entre os dois compartimentos. Estas diferenças podem ser decorrentes de fases diferentes de evolução da doença nos animais infectados, e pelo fato dos cães utilizados neste trabalho não serem obrigatoriamente portadores e lesões oculares.

Os valores de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* no plasma foram superiores aos encontrados no humor aquoso ($P < 0,05$) no trabalho de BRITO et al. (2006), que sugeriu a ocorrência de produção local de anticorpos no globo ocular. Também segundo EICHENBAUM et al. (1987), anticorpos podem ser encontrados em todas estruturas oculares, devido a sua produção local, ocorrendo reconhecimento de antígenos pelo sistema linfóide, como linfócitos B e algumas imunoglobulinas como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

O valor elevado de proteína total observado no soro de 16 cães pode ser decorrente do aumento de globulinas, resultante da ativação de células B (LAPPIN, 1989). Assim, foi observado aumento de globulinas no soro de 27 cães do grupo infectado que está relacionado à produção de anticorpos anti-leishmania, característico da resposta imune Th2, conforme confirmado por vários pesquisadores, entre eles, ALEXANDER; BRYSON (2005). Por outro lado os animais infectados por *Leishmania infantum* podem apresentar hipoalbuminemia secundária a proteinúria e ao comprometimento hepático (NOLI, 1999), que foi observada em 23 animais do presente estudo. Os parâmetros sorológicos, de proteína total e de albumina do grupo infectado são característicos de cães com leishmaniose, conforme descrito na literatura por CIARAMELLA et al (1997). O humor aquoso difere do plasma, devido a concentração muito baixa de proteínas e lipídios (GUSMAN et al., 2002). A albumina, gama-globulinas e as imunoglobulinas

são frequentemente isoladas, sendo a albumina encontrada em maior proporção (DIAS et al., 1979; AMUSWATEGUI et al., 2003).

Em cães do grupo controle, segundo BRITO et al. (2006), os valores proteicos, determinados pelo método Bradford, situam-se em torno de 25mg/dl. A desestabilização das barreiras oculares pode levar ao aumento de proteínas principalmente imunoglobulinas e fibrinogênio chegando até 2500mg/dl (BLOGG; COLES, 1971; COOLINS; MOORE 1991, SLATTER, 2005).

O método utilizado neste trabalho para detecção de proteínas totais no humor aquoso, o Microprote Piragalol, resultou em valores muito semelhante ao método de Sensiprot utilizado FALCÃO (2008). Semelhante a FALCÃO (2008) foi observada uma variação muito grande nos valores obtidos para a proteína total do humor aquoso tanto para os animais do grupo controle como dos infectados. Falcão (2008) também observou grande variação entre os valores de proteína total no humor aquoso comparando o olho esquerdo e o direito do mesmo cão.

O método Microprote tem sensibilidade para detectar albumina e globulina, deixando de fora outras frações proteicas e, por este motivo, FALCÃO (2008) comenta em seu trabalho que o método Bradford seria mais eficiente para este tipo de análise, e também recomenda a eletroforese para a detecção da albumina. Realmente existe diferença nos valores da quantificação de proteínas pelo método Bradford realizada por vários autores (BRADFORD, 1976; BOLLAG et al., 1996; GRUS et al., 2007; FALCÃO, 2008) no humor aquoso em cães normais.

Entre os cães com leishmaniose deste experimento, 10 apresentaram valores de proteína total superiores aos valores médios determinados por FALCÃO (2008). Se considerarmos a presença de IgG anti leishmania no humor aquoso (comprovada pelo ELISA), e a sensibilidade do Microprot® para detectar esta proteína, seria possível justificar este aumento; mas devido à grande variação individual que pode existir mesmo entre os cães normais, não podemos relacionar estas variações diretamente à infecção pela *leishmania*. Não foi possível verificar diferenças no conteúdo de albumina do humor aquoso, devido as limitações do método escolhido. A utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições desnaturantes seria uma alternativa mais recomendada por permitir a diferenciação das proteínas no humor aquoso, de acordo com o peso molecular (GUS et al 2007).

A Pro-MMP-2 foi detectada nos animais infectados (27/28) e nos controles. Segundo DIAS et al.(1979) é provável que a forma ativa desta MMP tenha alguma função nos processos fisiológicos da manutenção da matriz extracelular de estruturas oculares, e o fato da forma ativa ter sido detectada, mas em menor proporção, é indicativo de equilíbrio entre esta MMP e as TIMPs seus principais inibidores (TIMPs), que quando sofrem desregulação permitem a destruição da matriz extracelular. Quando avaliada a relação entre a quantidade de IgG do humor aquoso e a presença de Pro-MMP2 não se observa correlação, o que comprova a presença constitutiva desta pro-enzima não é afetada pelas imunoglobulinas anti *leishmania* do humor aquoso.

Em relação a MMP-2, a mesma só foi detectada em um cão infectado. Uma possível explicação para este fato é de que os inibidores de MMPs como as TIMPS poderiam estar atuando ainda de forma eficiente. Estudos em cães com uveíte comprovada ao exame clínico são necessários para comparar os resultados obtidos até agora. O equilíbrio entre MMPs e TIMPs na MEC é de importância crítica para a manutenção do tecido (KERRIGAN et al., 2000).

A Pro-MMP-9 e MMP-9 foram detectadas respectivamente em 10 e 11 cães dos 28 positivos para leishmaniose. Já no grupo controle, não foram observadas bandas correspondentes nos géis de zimografia. Tanto a MMP2 como a MMP9 são expressas em sítios ativos de destruição celular e inflamação crônica (DIAS et al., 1979; GUSMAN et al., 2002), características marcantes da leishmaniose.

Segundo DI GIROLAMO et al. (1996), as metaloproteinases encontradas em humor aquoso humano normal podem participar na renovação fisiológica da matriz extracelular no olho. Níveis elevados de MMPs 2 e 9 foram encontrados no humor aquoso de pacientes humanos e animais com uveíte induzida por LPS, onde estas MMPs provavelmente participam dos processos destrutivos e reparadores de tecidos (DI GIROLAMO et al 1996).

Na avaliação histológica, a forma ativa da MMP-9 foi observada em sete globos oculares (7/9), onde também havia processo inflamatório crônico, com intensidade variada, envolvendo diferentes estruturas oculares. Portanto a presença de MMP-9 não implica necessariamente em inflamação. O fato de a inflamação no globo ocular não ser observada em todos cães do grupo infectado deste estudo, pode ser decorrente de diferentes tempos de evolução da doença. A MMP-9 é

considerada um marcador inflamatório em lesões oculares superficiais como a blefarite (JENG et al., 2013). Além disso, as células imunes expressam MMP-2 e MMP-9 podem ultrapassar barreiras vasculares durante a migração celular (WU et al., 2007; EL SHANBRAWI et al., 2004).

GARCIA-ALONSO et al. (1998) relatam que as oftalmopatias que cursam com a LVC podem ou não estar associadas a sinais sistêmicos e, na maioria dos casos, se apresentam de forma bilateral. BRITO et al. (2006) encontraram valores médios da proteína total no humor aquoso dos animais com uveíte significativamente maiores ($P < 0,05$) quando comparados à média dos animais com outros sinais oculares ou sem sinais clínicos.

Os cães com leishmaniose do grupo infectado apresentavam sinais clínicos da doença, entretanto foram selecionados com base no diagnóstico de leishmaniose e da presença de sinais clínicos compatíveis com a doença, independente de apresentarem lesões oculares no exame macroscópico. Este fato pode ter interferido tanto no número de cães que apresentaram as formas inativa e ativa da MMP-9, como nos valores de anticorpos anti-leishmania que foram detectados no humor aquoso.

2.10 Conclusão

A presença de ProMMP-2 em animais do grupo controle comprova a produção constitutiva desta MMP.

A ausência da forma ativa da MMP-2 nos grupos controle e infectado sugere a não ativação ou inativação eficiente das mesmas por TIMPS. Talvez em cães com uveíte este equilíbrio seja interrompido; ou ainda os animais poderiam estar em diferentes tempos de evolução da infecção pela Leishmania.

Foram detectadas a Pro-MMP-9 e a MMP-9 no humor aquoso de cães com LV. A forma ativa desta MMP foi observada no humor aquoso de cães que também apresentavam lesões inflamatórias oculares.

A albumina, embora seja um marcador utilizado para aferir a permeabilidade das barreiras oculares não se apresentou como um parâmetro efetivo neste experimento devido as limitações do método de detecção utilizado.

2.11 Referências

- Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Let* n.99, p.17–23, 2005.
- Amusategui I, Sainz A, Rodríguez F, Tesouro MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol*, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.
- Berman ER. *Biochemistry of the eye*. New York. Plenum Press, 1991; p. 476.
- Blogg JR, Coles EH. Clinicopathological aspects of canine aqueous humor Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. Gel electrophoresis under non denaturing conditions. *Protein methods*. New York: John Wiley e Sons, 1996, (2), p.155-172.
- Boveland SD. et al. Immunohistochemical study of matrix metalloproteinases 2 and -9, macrophage inflammatory protein-2 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1 and -2 in normal, purulent and fungal infected equine corneas. *Vet ophthalmol*, 2010; 13(2): 81-90.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anais.. Biochem.*, 1996. v.72, p.248-254.
- BRASIL. Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 11 mai. 2012.
- Brito FLC. Patologia, resposta imune humoral e diagnóstico em cães com oftalmopatias decorrente da infecção natural por Leishmania (Leishmania) chagasi. Dissertação de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- Brito FLC, Alves LC, Maia FCL, Santos ESC, Laus JL, Meunier IMJ. Ocular alterations in dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2006. 58 (.5). p.768-775.
- Ciaramella P, Oliva G, Luna R, Ambrosio R, Cortese L, Persechino A, Gradoni L, Scaloni A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. *Vet Res*, 1997; 141: 539-543,.
- Collins BK, Moore CP. Diseases and surgery of the canine anterior uvea. In: Gellat, K.N. *Vet Ophthalmol*. Lippincott Williams e Wilkins, 1999; p.755-795.
- Couture, S. et al. Topical effect of various agents on gelatinase activity in the tear film of normal dogs. *Vet Ophthalmol*, Oxford. 2006. 9.(3).p. 157-164.

Daniels JT, Geerling G, Alexander RA, et al. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases during wound healing of human corneal tissue. *Experimental Eye Research*. London 2003.77.(6) p.653-664.

Davis K, Carter R, Tully T, Negulescu I, Storey E. Comparative evaluation of aqueous humor viscosity. *Vet Ophthalmol*. 2015.(18) p. 50 – 58.

Dernouchamps JP, Vaerman JP, Michiels J, Masson PL. Complexos imunes no humor aquoso e soro. *J Ophthalmol* 1977.84, p.24-31.

Di Girolamo , Verma MJ, McCluskey PJ, Lloyd A, Wakefield D. Increased matrix metalloproteinases in the aqueous humor of patients and experimental animals with uveitis, *Curr Eye Res*; Oct,1996.15(10) p.1060-8.

Dias PLR. Pstinflaommatory and Malignant protein patterns in aqueous humor Brustish .*J Ophythalmol*.1979.63. p.161.

Eichenbaum, JD. et al. Immunology of the ocular surface. *Immunol*. 1987.9.(11) p. 99-106.

Elshabrawi Y, Walch A , Hermann J, Egger G, Foster CS . Inhibition of MMP-dependent chemotaxis and amelioration of experimental autoimmune uveitis with a selective metalloproteinase-2 and -9 inhibitor. *J Neuroimmunol*.2004 (155), p.13–20.

Falcão MSA. Proteinograma do humor aquoso de cães (Canis familiares - LINNAEUS, 1758) clinicamente saudáveis. Dissertação de Mestrado .Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília,77 p. 2008.

Fraga DB, Solca MS, Silva VM, Borja LS. NASCIMENTOD, E.G. SANTOS, W.L.C. Temporal distribution of positive results og tests for detecting Leishmania infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A13 years survey and association with human disease .*Vet Parasitol.*, Amsterdam, 2012.190. p.591-594.

Garcia-alonso M. et al. Patología ocular asociada a leishmaniosis canina.Consulta de Difusión Veterinária.Portugal,1998. 6(54). p. 49-53.

Garcia-alonso M, Nieto CG, Requena JM , Alonso C, Navarrete I. Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during Leishmania infection in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasit Immunol*.1996.18.p.539-546.

Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK. Aqueous Humor Dynamics: A Review. *Ophthalmol J*.2010.(4) p. 52 – 59.

Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian J Med Biol Research*, Ribeirão Preto. Apr. 2004. 37.(4). p.615-23, .

Grus FH, Joachim SC, Pfeiffer N. Proteomics in ocular fluids. *Proteomics Clin. Appl.* 2007.1.p.876-888.

Gum GG, Mackay EO. Physiology of the Eye. In: GELATT, K.N. (Ed.) *Vet Ophthalmol*. Wiley-Blackwell. 2013. (5). p. 171 – 207.

Gusman H, Santana BR, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps ;Oct.2002. 110. (5). p.353-357.

Hazel SJ, Hull MA, Severing GA , Lauerman LH. Jr. Laboratory evaluation of aqueous humor in the healthy dog, cat, horse and cow. *American J Vet Resear.* Mar. 1985. 46 (3).p.657-659.

Itoh Y, Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem.* 2002.38.(21) p.36.

Jeng BH, Holland GN, Lowder CY, Deegan WF, Raizman MB, Meisler, DM. Anterior segment and external ocular disorders associated with human immunodeficiency virus disease. *Surv Ophthalmol* . 2013.3 (52).p.329– 368.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego: Academic Press. 1997.p.932.

Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. *J Orthod.* 2000. (.27).p.227– 233.

Koutinas AF. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Americ Animal Hosp Assoc.* 1999.35.p.376-383.

Lappin RM. et al. Clinical feline toxoplasmosis: Serologic diagnosis and therapeutic management of 15 cases. *J Vet Inter Med.* 1989.3 (3).p.139-143.

Lima VM. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* Apr 2003. 36 (4). p.485-9.

Meyer DJ, Harvey JW. *Vet Laborat Med: Interpretation and diagnosis*. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 373 p. 1998.

Miller PE. Structure and Function of the Eye. In: SLATTER, D.H. (Ed.) *Slatter's Vet Ophthalmol*, Saunders Elsevier. 2008.(4) p. 1 -19.

Molleda JM. et al. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *Israel J Vet Med*, Rishon Le-zion. 1993. (48).p. 173-178.

Nagase H, Tiebang K, Duanqing P. Activation of Membrane-type Matrix Metalloproteinase 3 Zymogen by the Proprotein Convertase Furin in the trans-Golgi Network. *Cancer Research*; 2002.7(3).

Noli C. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus*.1999. 9 (2).p16-24.

Novais AP, Lucas S, Abe AS, Fernandes W, Puerto G. & Almeida IL. Botropic poisoning in cattle: optional treatment. Technical Circular , Embrapa, UEPAE São Carlos, SP.1986. (3). p.29.

Ollivier FJ et al. Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrixmetalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis. *Americ J Vet* .2003.64.(9) p.1081-1087.

Ollivier FJ. et al. Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. *Vet Ophthalmol, Oxford*.2004.7.(6). p. 397–405.

Ollivier FJ. Proteinases of the cornea and precocular tear film (Invited Review). *Vet Ophthalmol. Oxford*. 2007. 10 (4) .p. 199-206.

Prado PF, Rocha MF, Sousa JF, Caldeira DI, Pasz GF, Dias ES. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais , Brasil, between 2007 and 2009. *Rev. Soc. Bras. Med*.2011.44.(5). p. 561-560.

Slatter D. Estrutura e função do olho. *Fundamento Da Oftalmologia Veterinária*.São Paulo.2005. 1(1). p.20-22.

Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* .2003.200.(4) .p.448-464.

Struble DT. et al. Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerativekeratitis. *Vet Ophthalmol, Oxford*.2000.3. (2-3). p. 111-119.

Wu B, Crampton SP, Hughes CC. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity*.2007.(26). p.227–239.

Tabela 01- Resultados da bioquímica sérica dos cães infectados naturalmente por *leishmania infantum*. D.O do soro e humor aquoso, albumina do soro, proteínas totais do soro e do humor aquoso, globulinas do soro e atividade gelatolítica das metaloproteínases 2 e 9 .

ANIMAL	D.O.		Albumina	Proteína Total	PROTEÍNA TOTAL	GLOBULINA	PRO MMOP9	MMP9	PRO MMP2	MMP2
	SORO	HUMOR	SORO	HUMOR	SORO	SORO				
1	0.984	0.699	1.09	0,62	10.3	9.21	3.975	3.45	5.94	X
3	0.347	0.376	3.03	12,93	8	4.97	X	X	3.54	X
4	0.989	1.431	1.37	13,41	11.7	10.33	X	X	4.777	X
5	0.693	0.865	1.54	14,38	8.8	7.26	X	X	3.759	X
6	0.904	1.27	1.22	14,09	8.1	6.88	X	X	2.375	X
7	0.88	1.339	0.85	13,38	6.5	5.65	2.303	2.59	3.028	X
9	0.633	0.778	1.68	13,52	6.9	5.22	X	X	3.048	X
10	0.582	0.454	1.82	12,17	5.4	3.58	X	X	4.873	X
11	0.329	0.175	0.89	0,62	6	5.11	X	X	4.508	X
12	0.614	0.131	2	7,78	8.4	6.4	X	1.624	3.641	3,036
14	0.813	1.02	1.45	2,44	12	10.55	X	X	5.308	X
15	0.917	1.373	1.57	5,36	11.2	9.63	X	X	6.184	X
16	0.656	1.381	1.12	10,18	11.5	10.38	X	X	7.775	X
18	0.722	0.775	0.69	14,42	7.9	7.21	1.703	X	4.079	X
20	1.535	1.454	1.75	3,73	8.3	6.55	2.388	2.632	4.083	X
21	1.251	1.178	0.86	1,29	7.8	6.94	X	X	4.772	X
22	1.263	0.998	2.15	1,37	9.5	7.35	X	X	4.927	X
27	0.484	0.092	1.16	0,62	7.7	6.54	X	2.619	5.633	X
35	0.818	1.028	1.5	0,46	6.4	4.9	2.857	2.258	9.534	X
41	0.809	1.659	0.95	1,39	9.9	8.95	2.524	1.817	3.553	X
42	1.019	1.223	1.84	13,74	11.6	9.76	X	X	2.233	X
43	1.018	0.526	0.65	1,44	6.8	6.15	2.481	3.509	X	X
44	1.072	2.153	0.79	0,26	7.9	7.11	2.293	2.504	4.373	X
45	1.569	0.8585	3.04	1,56	8.9	5.86	X	X	5.066	X
47	1.578	1.584	2.52	6,92	9.4	6.88	X	X	4.897	X
48	1.421	0.9755	2.84	1,76	8.2	5.36	2.872	2.611	3.994	X
49	1.577	1.0875	2.65	1,54	8.1	5.45	X	X	4.153	X
50	1.35	0.996	2.88	1,36	11.3	8.42	4.452	4.02	3.929	X

Tabela 02- Resultados da bioquímica sérica dos cães do grupo controle. D.O do soro e humor aquoso, albumina do soro, proteínas totais do soro e do humor aquoso, globulinas do soro e atividade gelatolítica das metaloproteinases 2 e 9 .

ANIMAL	D.O.		ALBUMINA	Proteína Total	PROTEÍNA TOTAL	GLOBULINA	PRO MMOP9	MMP9	PRO MMP2	MMP2
	SORO	HUMOR	SORO	HUMOR	SORO	SORO				
8	0.215	0.261	2.71	3,15	7.7	4.99	X	X	3.716	X
17	0.114	0.15	2.83	13,64	7.9	5.07	X	X	4.507	X
19	0.072	0.064	2.99	2.77	7.3	4.31	X	X	4.208	X
46	0.138	0.111	2.87	8.26	7.6	4.73	X	X	2.626	X

Apêndice A “ Referências da Introdução Geral”

Albaugh RA, Roush JK, Rankin AJ. et al. Fluorophotometric and tonometric evaluation of ocular effects following aqueocentesis performed with needles of various sizes in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2011.72.p.556-561.

Alvar J. et al. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004.57.p. 1-88.

Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. jan./fev. 2004. 20 (1). p. 259-265.

Amusatogui I, Sainz A, Rodríguez F, Tesouro MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol.* 2003.18.(2). p. 147-156.

Anderson, Wendy, Corbett, John. Exploring English with online corpora: an introduction. *Rbla*, London. 22 mar. 2010.4. (10). p.1025-1030.

Ascher KW. Veins of the aqueous humor in glaucoma. *Boll Ocul.* 1954.33.(3).p.129–44.

Baneth G, Koutinas A, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trend. in Parasit.* 2008. 24.p. 324-330.

Barata RA. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. *Biomed Res Int*, 2013. p. 405083.

Blavier A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J.* Sep 2001.162 (2). p. 108-20.

Bonnans C, Chou J , Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Reviews Molecular Cell Biology* .2014.15. (12). p. 786–801.

Brejchova et al .Matrix metalloproteinases in recurrent corneal melting associated with primary Sjörger’s syndrome. Published online. Nov.2009.15. p. 2364–2372.

Brito FLC. Patologia, resposta imune humoral e diagnóstico em cães com oftalmopatias decorrente da infecção natural por *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. Dissertação de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

Chalcatana FC. Bioquímica do Humor Aquoso e Humor Vítreo. 2011.17f. Seminário apresentado da disciplina de Bioquímica do Tecido Animal - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Disponível em://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/flor_humor_aquoso_vitreo.pdf

CHAPPUIS, François et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nat. Rev. Microbiol*, v. 5, n. 11, p.7-16, nov. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1748>.

Ciaramella P, Corona M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. *Compend. on Contin. Educat. for the Pract. Veterin*. 2003. 25. (5). p.358-369.

Cunha AM ,Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* .sp. Nota prévia. *Hospital*. 1937.11. p.3-9.

Dernouchamps JP, Vaerman, Michiels J , Masson PL . Complexos imunes no humor aquoso e soro. *Am J Ophthalmol*.1977.84. p. 24-31.

Dong. Q. et al. Expression of the reversion- inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs and matrix metalloproteinase-14 in neuroblastoma and the role in tumour metastasis. *Int J Exp Pathol*, Oxford.Aug.2010. 91.(4). p. 368-73.

Doweiko JP, Nompleggi DJ. Role of albumin in human physiology and pathophysiology.1991.15 (2). p.207-11..

Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Barcelona, Spain. Canine Leishmaniasis: an update. Wiesbaden: H. R. Vet. 1999. p. 6-10.

Fraga DB. et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: a 13 years survey and association with human disease. *Vet Parasitol*.Dec 21,2012. 190.(3-4). p. 591-4.

Furumoto K. et al. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs. *Hepatol*, Baltimore. Jan.2001.3. (1) p. 189-95.

Garcia-Alonso M. et al. Diagnostico y tratamiento de la uveitis anterior inmunomediada en leishmaniosis canina. In: Congresso Ibérico de Parasitologia, 4, 1995, Santiago de Compostela, Anais.. Santiago de Compostela. p. 198,1995.

Garcia-Alonso M. et al. Patologia ocular associada a leishmaniose canina. *Consulta de Difusão Veterinária*, Portugal,1998. 6. (54). p. 49-53.

Garcia-Alonso M. et al. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasit Immunol* .Nov 1996. 18(11). p. 539-46.

Gilger BC, Bentley E, Ollivier FJ. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: Gelatt KN. *Vet Ophthalmol*. Iowa: Blackwell Publishing.2007. 4.p.690-752.

Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK. Aqueous Humor Dynamics: A Review. *Ophthalmol J*.2010. (4). p. 52 – 59.

Gum GG, Mackay EO. Physiology of the Eye. In: GELATT, K.N. (Ed.) *Vet Ophthalmol*. Ed. Wiley-Blackwell.2013.5. p.171 – 207.

Haddad A, Laicine EM, ALMEIDA JC. Origin and renewal of the intrinsic glycoproteins of the aqueous humor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*.1991.229. (4). p.9-371.

Jacintho APP, Melo GD, Machado GF, Bertolo PHL, Moreira PRR, Momo C, et al, Expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol R*. 2018.117.p.1 - 9.

KAllberg ME, Brooks DE, Ollivier FJ, Nelligan M, Lewis PA, Gelatt KN. Differences in location of matrix metalloproteinases 2 and 9 in normal and ulcerated canine corneas. *Vet Ophthalmol*.2004. (.7). p.439.

Kaufman PL, Alm A. Hidrodinámica del humor acuoso. *Fisiología del ojo*. Elsevier . 2004.10.

Koutinas AF . et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. American Animal Hospital Association, Lakewood*.1999.35. p.376-383.

Lainson R. et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, [s.l.], v. 81, n. 3, p.517-517, jan. 1987. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90187-8](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(87)90187-8).

Luvizotto MCR. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: 10 FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. Jaboticabal. Anais.. do Fórum de Leishmaniose Visceral canina, p.15-22, 2006.

Macknight ADC, Mclaughlin CW, Peart D, Purves RD, Carré DA , Civan MM. Formation of the aqueous humor. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2000. (.27) p.100–106.

Mandal M, Mandal A, Das S, Chakraborti T, Sajal C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell. Biochem*. 2003.252 (1-2). p.305-329.

Manik, Goel M, Renata G, Picciani, Richard K , Lee, Sanjoy K ,Bhattacharya. Aqueous Humor Dynamics: A Review. *Ophthalmol J*. Published online. Sep3, 2010.(4). p.52–59.

Marangoni NR, Melo GD , Moraes OC, Souza MS , Perri SHV, Machado GF. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasit Immunol*. 2011.33. p.330 - 334.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasit. Tod.* 200.16 (5) .p. 188-9.

Melo GD, Machado GF. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. *Cell Tissue Res.* Dec, 2011.346 (3) .p. 293-304.

Molleda JM et al. Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *J Israel Vet Med.* 1993. (48) p.173-178.

Muh-Shy C, Hou PK, Tong-Yuan T, Lin BJ. Blood-ocular barriers. *Tzu Chi Med. J.*, 2008.(20). p. 25–34.

Nagase H, Visse, R , Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research.* 2006.69 (3). p. 562–73.

Noli C. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus.*1999. 9 (2).p.16-24.

Ollivier F. Matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, connective tissue growth factor in the equine tear fluid: possible implications in corneal wound healing [tese]Gainesville: Universidade da Florida; Parasit Immunol, Oxford. 1996.18.p. 617-623.

Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press; 1998.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical Spectrem of leishmaniasis.*Clin Infect Dis.*1996.22 .p.1-13.

Peña MT. et al. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dog. *Vet Ophthalmol.*2000.3 (1). p.35-4.

Peña MT, Naranjo C, Klauss G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, et al. Histopathological features of ocular Leishmaniosis in the dog. *J. Comp. Path.*2008. 138. p.32-39.

Prado PF. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. *Rev Soc Bras Med Trop.*Oct 2011.44 (5) p.561-6.

Rosemberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia.*2002.39(3) p.279-291.

Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2007.47. p. 211–42.

Slansky HH, Freeman MI, Itoi M. Collagenolytic activity in bovine corneal epithelium. *Arch Ophthalmol.* 1968 .80 .p. 496-8.

Slatter D; Dietrich U. Córnea e esclera. In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais, Barueri: Manole.2007. 2 (3). p. 1368-1396.

Smith RS, Rudt LA. Ocular vascular and epithelial barriers to microperoxidase. Invest.Ophthalmol.1975. (14).p.556–560.

Sternlicht MD , Werb Z. How Matriz Metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev.Cell.Dev Biol, v.17, p. 463-516, 2001.

Strauss-ayali D , Baneth G. Canine Visceral Leishmaniasis. In: Recente Advances in Canine Infectious Diseases, Carmichael L.,I thaca, NY, 2001. Disponível em: <<http://www.ivis.com.br>>. Acesso em: 07 set. 2005.

Van Der Woerd. A Management of Intra Ocular Inflamamtory Disease. Cl. Tec. Small Anim Practice 2001.16 (1) . p 58-61.

Whicher J, Spence C. When is serum albumin worth measuring? Ann Clin Biochem.1987. (24). p.572-80.

Willson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. Microb Pathog. Apr 2005.38.(4). p. 147-60.

World Health Organization (WHO). Control of neglected tropical diseases. Stat. of endem. of visc. Leishm., worldwide, . World Health Organization, 2015. Disponível em<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf> Acesso em 28 de junho de 2018.

Zatelli A. et al. A Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. American Journal of Veterinary Research.2003.64 (5).p.558-561.

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Inflamação do encéfalo de cães com Leishmaniose Visceral: Investigação da ativação da resposta imune inata e adaptativa"**, Processo FOA nº 00633-2016, sob responsabilidade de Gisele Fabrino Machado apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 22 de Fevereiro de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 22 de Junho de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 22 de Julho de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Brain inflammation in dogs with visceral leishmaniasis: Investigation of adaptative and innate immune response activation"**, Protocol FOA nº 00633-2016, under the supervision of Gisele Fabrino Machado presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 22, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 22, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 22, 2019.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br