

**FERDINAN ALMEIDA MELO**

**ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO FÍGADO, BAÇO E  
LINFONODOS CERVICAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM  
*Leishmania (Leishmania) chagasi***

**BELO HORIZONTE**

**Setembro 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDINA LEGAL**

**TESE DE DOUTORADO**

**ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO FÍGADO, BAÇO E  
LINFONODOS CERVICAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM  
*Leishmania (Leishmania) chagasi***

**BELO HORIZONTE**

**Setembro 2008**

**FERDINAN ALMEIDA MELO**

**ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO FÍGADO, BAÇO E  
LINFONODOS CERVICAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM  
*Leishmania (Leishmania) chagasi***

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Patologia.

**Área de concentração:** Patologia Geral

**Orientador:** Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri.

**Co-orientadora:** Prof. Dra. Kátia da Silva Calabrese

**Belo Horizonte**

**Faculdade de Medicina – UFMG**

**2008**

M528a Melo, Ferdinan Almeida.  
Alterações da matriz extracelular do fígado, baço e linfonodos cervicais de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* [manuscrito]. / Ferdinan Almeida Melo. -- Belo Horizonte: 2008. 101f.: il.  
Orientador: Wagner Luiz Tafuri.  
Co-orientadora: Kátia da Silva Calabrese.  
Área de concentração: Patologia Geral.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose/patologia. 2. Matriz Extracelular. 3. Dissertações Acadêmicas. I. Tafuri, Wagner Luiz. II. Calabrese, Kátia da Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM: QX 70



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **FERDINAN ALMEIDA MELO**, nº de registro 2005205138. Às quatorze horas do **dia vinte e seis de setembro de dois mil e oito**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO FÍGADO, BAÇO E LINFONODOS CERVICAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIA (LEISHMANIA) CHAGASI”**, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o presidente da comissão, Prof. Wagner Luiz Tafuri, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Profa. Kátia da Silva Calabrese/Co-orientadora	Instituição: FIOCRUZ/RJ	Indicação: <u>APROVADO</u>
Profa. Ana Lúcia Abreu Silva	Instituição: UEMA	Indicação: <u>APROVADO</u>
Profa. Marlene Isabel Vargas Vitoria	Instituição: UFV	Indicação: <u>APROVADO</u>
Profa. Marilene Suzan Marques Michalick	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>
Prof. Marcelo Vidigal Caliari	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADO</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado APROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 26 de setembro de 2008.

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Orientador Wagner Luiz Tafuri

Profa. Kátia da Silva Calabrese Kátia da Silva Calabrese

Profa. Ana Lúcia Abreu Silva Ana Lúcia Abreu Silva

Profa. Marlene Isabel Vargas Vitoria Marlene Isabel Vargas Vitoria

Profa. Marilene Suzan Marques Michalick Marilene Suzan Marques Michalick

Prof. Marcelo Vidigal Caliari Marcelo Vidigal Caliari

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Coordenador Wagner Luiz Tafuri

PROF. WAGNER LUIZ TAFURI  
coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia  
Faculdade de Medicina/UFMG






FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



**DECLARAÇÃO**


A comissão examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Wagner Luiz Tafuri, Kátia da Silva Calabrese, Ana Lúcia Abreu Silva, Marlene Isabel Vargas Vitoria, Marilene Suzan Marques Michalick e Marcelo Vidigal Caliari, aprovou a defesa da tese intitulada: **“ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR DO FÍGADO, BAÇO E LINFONODOS CERVICAIS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIA (LEISHMANIA) CHAGASI”** apresentada pelo doutorando **FERDINAN ALMEIDA MELO** para obtenção do título de Doutor em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 26 de setembro de 2008.

  
Prof. Wagner Luiz Tafuri  
Orientador

  
Profa. Kátia da Silva Calabrese  
Co-orientadora

  
Profa. Ana Lúcia Abreu Silva

  
Profa. Marlene Isabel Vargas Vitoria

  
Profa. Marilene Suzan Marques Michalick

  
Prof. Marcelo Vidigal Caliari

*Aos meus pais,  
Domingos Melo e Zulmira Melo*

*À Weverton Marcos Sampaio  
“in memoriam”*

*À professora Dra. Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira  
“in memoriam”*

*"Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida.  
Esses são os imprescindíveis."*

**Bertolt Brecht**



## AGRADECIMENTOS

---

*A Deus.*

*Aos meus pais, irmãos e familiares pelo apoio, compreensão e carinho de sempre.*

*À Arina Ribeiro, com todo carinho.*

*A Eliane Perlatto e família, uma irmã que ganhei em Minas... Cíntia Alves, Raul Ribeiro, Wanderson Lima, Felipe Cosenza que fizeram parte da equipe de trabalho nessa longa e árdua jornada. Hoje, amigos pra toda a vida.*

*Ao professor Wagner Tafuri, meu orientador, meu amigo. Agradeço pela amizade, oportunidade e confiança com a qual me recebeu para o Doutorado. Agradeço pelos conselhos, ensinamentos, pelos valiosos momentos que proporcionou a toda família NIPE, ao abrir as portas de sua casa, de sua família. Ao senhor, o meu muito obrigado.*

*À minha Co-orientadora Dra. Kátia da Silva Calabrese por todo apoio, amizade, incentivo e confiança desde o início do doutorado.*

*Ao Prof. Washington Luiz Tafuri, pelo exemplo de vida.*

*À Fernando Andrade e Hélio Martins e familiares, meus amigos-irmãos. Juntos enfrentamos as batalhas da vida, desde a Graduação e agora na Pós-Graduação. Sem eles, com certeza, não seria nada fácil. Obrigado pelo apoio e amizade.*

*À Maria Leticia, Sandra Moura, Maria Noviello, Marta Figueiredo, Vanessa, Luana Dourado, Cláudia Brant, Silvia Cangussu, Isabel, Carolina, Leticia, Mirna, amigos da Pós-Graduação e do laboratório que tornam o dia-a-dia de trabalho mais alegre. Jamais esquecerei vocês.*

*Ao Departamento de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina.*

*Às funcionárias do Departamento de Patologia/ICB, sempre prontas a nos ajudar: Regina, Vânia, Olinda e Jaqueline, obrigado pela amizade.*

*Aos amigos da Fiocruz-RJ: Dr. Sylvio Celso Gonçalves da Costa, Celeste Souza, Luiz Otávio, Flávia.*

*Aos amigos Talmir Quinzeiro, Lilian Jordão, Frankmar Fonseca, Emizael Ângelo, Priscilla Sherloski, Patrícia Santana, Fabrício Otoni.*

*Aos professores da Pós-Graduação em Patologia Geral/ICB do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina legal da Faculdade de Medicina/UFMG. Em especial à professora Dra. Ana Margarida Nogueira “in memoriam”, uma mulher brilhante, de fibra que transpirava a dignidade de seu trabalho.*

*Às professoras Dra. Denise Carmona Cara Machado e Dra. Rosa Arantes, pelo convívio, amizade e ensinamentos constantes.*

*Ao CNPq e FAPEMIG pela bolsa concedida.*

*À Universidade Estadual do Maranhão – UEMA*

*Aos amigos da Universidade Estadual do Maranhão pelo apoio e amizade: Professora Dra. Ana Lúcia Abreu Silva, Professor MSc. José Gomes Pereira, Professor MSc. Cláudio Luís Nina*

*Gomes, Professora Dra. Maria Inez Silva, Professor Dr. Hamilton Santos, Professor Dr. Fábio Henrique Andrade, Professora Dra. Alcina Carvalho Neta, Professora MSc. Maria do Socorro, Professor MSc. Hailton Rogeris, Professor MSc. Francisco Carneiro, Iracema Gomes.*

*Ao professor Dr. Geovanni Dantas Cassali, pela amizade e dedicação à arte de ensinar.*

*Ao professor Marcelo Vidigal Caliarí pela amizade e pela contribuição na construção das macros para as análises das imagens.*

*Aos professores Dr. Anilton César Vasconcelos e Dr. Gregory Thomas Kitten, relatores da minha qualificação, pelos ensinamentos e conselhos dados para o aprimoramento desta pesquisa.*

*Ao professor Dr. Hélio Chiarini-Garcia pelo auxílio na confecção das pranchas e pela aprendizagem.*

*À Everton Carvalho “in memoriam”.*

*Ao meu grande amigo Weverton Sampaio “in memoriam” que partiu deixando uma imensa saudade.*

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.*

*Obrigado!*

Ferdinan Almeida Melo

# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1. Leishmanioses.....	01
1.2. Leishmaniose Visceral Humana (LVH).....	03
1.3. Leishmaniose Visceral Canina (LVC) .....	04
1.3.1. Aspectos clínicos e patológicos da LVC.....	06
1.4. Interação <i>Leishmania</i> hospedeiro vertebrado.....	08
1.5. Alterações da Matriz Extracelular (MEC) .....	10
1.5.1. Sistema Colágeno.....	14
1.5.2. Fibronectina (FN) .....	16
1.5.3. Laminina (LN) .....	18
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1. Objetivos Gerais.....	20
2.2. Objetivos Específicos.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	21
3.2. Animais.....	21
3.2.1. Critérios de inclusão no estudo.....	21
3.3. Grupos Experimentais.....	21
3.4. Coleta e processamento histológico do material.....	22
3.4.1. Punção de medula óssea.....	22
3.4.2. Eutanásia dos animais.....	22
3.4.3. Coleta de fragmentos dos órgãos.....	23
3.4.4. Avaliação histopatológica dos órgãos.....	23
3.4.5. Técnica da hematoxilina-Eosina (H&E) .....	24
3.4.6. Avaliação da densidade de parasitos nos órgãos.....	24
3.4.7. Técnica da estreptoavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> .....	24
3.4.8. Caracterização imuno-histoquímica da laminina (LN) e do infiltrado inflamatório nos órgãos pela técnica da estreptoavidina-peroxidase....	25
3.4.9. Caracterização imuno-histoquímica da Fibronectina (FN).....	26
3.5. Estudo do colágeno.....	28
3.6. Análise morfométrica das fibras colágenas, laminina, fibronectina e da expressão das CR3 positivas.....	29
3.7. Análise estatística.....	31
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1. Avaliação clínica dos animais.....	32
<b>4.2. Fígado.....</b>	<b>33</b>

4.2.1. Macroscopia.....	33
4.2.2. Microscopia .....	35
4.2.3. Avaliação dos parâmetros bioquímicos hepáticos .....	37
4.2.4. Avaliação das fibras reticulares hepáticas pela prata amoniaca de Gomori.....	39
4.2.5. Correlação entre o parasitismo hepático e a deposição de colágeno	41
4.2.6. Avaliação da laminina (LN) hepática.....	42
4.2.7. Correlação entre a expressão da laminina e o parasitismo hepático....	44
4.2.8. Avaliação da fibronectina (FN) hepática.....	45
<b>4.3. Baço.....</b>	<b>47</b>
4.3.1. Macroscopia.....	47
4.3.2. Microscopia.....	48
4.3.3. Avaliação das fibras colágenas esplênicas pela Prata amoniaca de Gomori.....	52
4.3.3.1. Espessura da cápsula esplênica.....	52
4.3.3.2. Correlação entre o parasitismo esplênico e a espessura da cápsula do baço.....	53
4.3.3.3. Deposição de colágeno no parênquima esplênico.....	54
4.3.3.4. Correlação entre o parasitismo esplênico e a deposição de colágeno no parênquima esplênico.....	56
4.3.4. Avaliação da laminina (LN) esplênica.....	57
4.3.4.1. Correlação entre a expressão da laminina e o parasitismo esplênico.....	59
4.3.5. Avaliação da Fibronectina (FN) esplênica.....	60
<b>4.4. Linfonodo Cervical.....</b>	<b>62</b>
4.4.1. Macroscopia.....	62
4.4.2. Microscopia.....	63
4.4.3. Avaliação das fibras colágenas dos linfonodos cervicais pela Prata Amoniaca de Gomori.....	67
4.4.3.1. Correlação entre o parasitismo do linfonodo cervical e a deposição de colágeno.....	69
4.4.4. Expressão da Laminina (LN) no linfonodo cervical.....	71
4.4.4.1. Correlação a expressão da laminina (LN) e parasitismo no linfonodo cervical.....	73
4.4.5. Avaliação da Fibronectina (FN) nos linfonodos cervicais.....	74
4.4.6. Caracterização do infiltrado inflamatório nos órgãos .....	76
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

---

<b>Gráfico 1.</b> Valores percentuais do número de animais naturalmente infectados com <i>Leishmania chagasi</i> (assintomáticos e sintomáticos) que apresentaram sinais clínicos durante a avaliação,,,	32
<b>Gráfico 2.</b> Alterações histopatológicas observadas no fígado de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> , grupos assintomáticos e sintomáticos. Critérios adotados.....	37
<b>Gráfico 3.</b> Número de amastigotas marcadas pela imuno-histoquímica no fígado dos cães dos grupos assintomáticos e sintomáticos (* p<0,05 Teste T não pareado).....	38
<b>Gráfico 4.</b> Deposição de colágeno no fígado de cães nos diferentes grupos estudados. Prata Amoniaca de Gomori , (ANOVA * p<0,0001).....	41
<b>Gráfico 5.</b> Correlação entre o parasitismo hepático e a deposição de colágeno no fígado de cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> . Pearson (r=0,7124, p<0,0001).....	41
<b>Gráfico 6.</b> Análise morfométrica da expressão de laminina hepática pela técnica imuno-histoquímica cães nos diferentes grupos estudados.....	44
<b>Gráfico 7.</b> Correlação entre a carga parasitária hepática e a expressão da laminina no parênquima hepático. (Pearson, r=,04838, p= 0,0068).....	44
<b>Gráfico 8.</b> Análise morfométrica da fibronectina no fígado.....	47
<b>Gráfico 9.</b> Alterações histopatológicas observadas no baço de cães naturalmente infectados, sintomáticos e assintomáticos.....	51
<b>Gráfico 10.</b> Número de amastigotas marcadas pela imuno-histoquímica no baço dos cães sintomáticos e assintomáticos, (*p = 0,0014 Teste T não pareado).....	51
<b>Gráfico 11.</b> Espessura da cápsula esplênica nos grupos estudados. Prata Amoniaca de Gomori,(*** p<0.001; * P<0.05, Teste T de Tukey).....	53
<b>Gráfico 12.</b> Correlação entre o parasitismo esplênico de cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> (avaliado por imuno-histoquímica) e a espessura da cápsula do baço (Prata Amoniaca de Gomori).....	53
<b>Gráfico 13.</b> Deposição de colágeno no parênquima esplênico dos grupos de cães estudados.....	56
<b>Gráfico 14.</b> Correlação entre o parasitismo esplênico de cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> (avaliado por imuno-histoquímica) e a deposição de colágeno na cápsula do baço (Prata Amoniaca de Gomori).....	56
<b>Gráfico 15.</b> Análise morfométrica da expressão de laminina esplênica pela técnica imuno-histoquímica em cães nos diferentes grupos estudados.....	59
<b>Gráfico 16.</b> Correlação entre a carga parasitária esplênica e a expressão da laminina no parênquima esplênico. Pearson, r=0,6159, p= 0,0003.....	59
<b>Gráfico 17 –</b> Análise morfométrica da expressão de fibronectina esplênica nos diferentes grupos estudados.....	62
<b>Gráfico 18.</b> Alterações histopatológicas observadas no linfonodo cervical de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> nos grupos sintomáticos e assintomáticos.....	66

<b>Gráfico 19.</b> Número de amastigotas marcadas pela imuno-histoquímica nos linfonodos cervicais nos grupo de cães sintomáticos e assintomáticos não significativos, ( $p = 0,1767$ , Teste T não pareado).....	67
<b>Gráfico 20.</b> Deposição de colágeno no parênquima de linfonodo cervical (região cortical e paracortical) nos diferentes grupos de cães estudados. Prata Amoniacal de Gomori, ( $*p=0,0265$ ).....	69
<b>Gráfico 21.</b> Correlação entre o parasitismo dos linfonodos cervicais de cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> (avaliado por imuno-histoquímica); A - Deposição de colágeno na região cortical. B - deposição de colágeno no parênquima dos linfonodos cervicais (Prata Amoniacal de Gomori).....	70
<b>Gráfico 22.</b> Análise morfométrica da expressão de laminina nos linfonodos cervicais de cães pela técnica imuno-histoquímica nos diferentes grupos estudados.....	73
<b>Gráfico 23.</b> Correlação entre o parasitismo dos linfonodos cervicais de cães naturalmente infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> e a carga parasitária. Pearson ( $r=0,4612$ , $p=0,0103$ ).....	73
<b>Gráfico 21.</b> Análise morfométrica da expressão de fibronectina nos linfonodos cervicais nos diferentes grupos estudados.....	76

## ÍNDICE DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Peso relativo (peso do fígado/peso corporal) dos fígados dos animais dos grupos assintomáticos, sintomáticos naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> e grupo controle.....	33
<b>Tabela 2.</b> Avaliação dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos em cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> e animais não infectados.....	38
<b>Tabela 3.</b> Peso relativo (peso do baço/peso corporal) dos baços dos animais dos grupos assintomáticos, sintomáticos naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> e do grupo controle.....	48
<b>Tabela 4.</b> Peso relativo (peso do linfonodo cervical/peso corporal) dos linfonodos cervicais dos cães dos grupos assintomáticos, sintomáticos naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> e do grupo controle.....	63



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Imagens para os comandos mostradas pelo software KS300 para determinação da deposição de colágeno no parênquima hepático. (A) Digitalização da imagem; (B) Seleção dos pixels das fibras colágenas; (C) Obtenção da imagem binária para posterior obtenção da área correspondente ao colágeno; (D) Imagem da área correspondente ao colágeno..... 30
- Figura 2:** Fígado de cão sintomático naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (órgão fixado em formol 10%) Observar superfície irregular caracterizada por lesões de coloração escura após fixação, mas que anteriormente eram brancacentas a fresco (setas brancas). Essas lesões são distribuídas difusamente em todos os lobos, de tamanhos e formas variados, e por vezes promovendo áreas de depressões na superfície. .... 34
- Figura 3A-F:** Cortes histológicos parafinados de fígado de cães naturalmente infectados com *L. (L) chagasi*. A e B – Cão assintomático. (A)- Espaço portal com infiltrado celular de plasmócitos (setas), linfócitos e macrófagos. Notar hepatócitos em degeneração hidrópica (cabeça de seta). Congestão sinusoidal pode ser observada (CS). , e em (B) Observar formas amastigotas de *Leishmania* nos macrófagos (seta larga) e hepatócitos vacuolizados (células baloniformes) (cabeças de seta). (C) Cão sintomático. Granuloma intralobular contendo macrófagos (células epitelióides) (setas largas), plasmócitos e linfócitos (seta pequena). Hepatócitos com degeneração hidrópica (cabeça de seta). (D,E)- Cão assintomático. (D) Presença de granuloma intralobular contendo células epitelióides com núcleos alongados ou ovais (seta larga), linfócitos (seta pequena) e plasmócitos (cabeça de seta), e em (E) mesmo campo mostrando amastigotas no interior dos macrófagos dos granulomas (setas). (F)- Cão sintomático: Notar no campo, células de Kupffer intensamente parasitadas (setas largas). DB- ducto biliar; LV-vaso linfático; VP- veia porta; S- sinusóide; ES-esteatose; C: congestão. A,C,D-H&E; B,E,F- Estreptoavidina-peroxidase. Todas as barras =16µm..... 36
- Figura 4A-F:** Cortes histológicos parafinados de fígado de cães controle e cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Cão controle. Observar delicada trama de fibras colágenas (reticulares) intralobulares delineando os sinusóides (setas). (B) Cão sintomático. Observar fibras colágenas intralobulares com espessamento marcante (setas). (C,D) Cão assintomático. (C) Notar fibras reticulares espessadas partindo do espaço porta em direção ao lóbulo evidenciando os sinusóides. (D) Detalhe da figura anterior mostrando fibras reticulares espessadas ressaltando os sinusóides. (E) Cão assintomático: Granuloma intralobular (seta) mostrando raras fibras colágenas no seu interior (cabeças de seta). (F) Cão sintomático: Observar um notável espessamento das fibras colágenas e por vezes com enclausuramento de uma única célula (hepatócito) (setas brancas). Hematoxilina-Eosina. (VP) Veia Porta; (DB) Ducto Biliar; (S) Sinusóides. Prata Amoniacal de Gomori. Barras (A,B,D,E e F) = 16µm e em (C) = 32µm. .... 40
- Figura 5A-F** – Cortes congelados de fígado de cães controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. (A,B) Cão Controle: Expressão da laminina em células de estruturas da região portal (setas). (C,D): Cão Assintomático: (C) Presença de laminina nas estruturas vasculares e em (D) granuloma com poucas células positivas para laminina (setas). (E,F): Cão Sintomático: Presença de marcação nos sinusóides (setas) de forma difusa. No canto direito inferior observar um granuloma sem marcação com amastigotas (seta), e em (F) Notar forte marcação da laminina nos sinusóides. Estrepto-avidina-peroxidase. Todas as Barras = 50 µm..... 43
- Figura 6A-C:** Cortes histológicos congelados de fígado de cães controle e de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: (A) Cão Controle: Presença discreta de fibronectina no lóbulo hepático; (B) Cão assintomático: Marcação positiva para fibronectina no lóbulo hepático. Observar no centro da figura forte marcação ao redor de um ramo de um grande vaso portal; (C) Cão Sintomático: Marcação exuberante e difusa no lóbulo hepático. Imunofluorescência para detecção de fibronectina Todas as Barras 50=µm..... 46

- Figura 7** – Cortes Histológicos de baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: (A,B,C) Cão Assintomático: (A) observar cápsula espessada (cabeças de seta), polpa vermelha congesta (setas) e polpa branca reativa, apresentado folículo linfóide evidente. (B,C) detalhes da figura anterior, sendo em (B) região da polpa vermelha contendo macrófagos hipertróficos e vacuolizados, sendo alguns deles repletos de formas amastigotas de *Leishmania* (setas). Em (C): detalhe das células do folículo linfóide (polpa branca reativa). (D) Cão Sintomático: folículo linfóide sem formação de centro germinativo e com diminuição numérica de linfócitos, sendo esses substituídos por macrófagos intensamente parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* (setas). (E,F) Cão Assintomático: Notar a presença de formas amastigotas imunomarcadas na polpa vermelha (setas); e em (F) observar parasitismo na intimidade da trabécula esplênica (cabeças de seta) e nos macrófagos localizados no interior da mesma (seta). Presença de (A-D) Hematoxilina-Eosina; (E-F) Estreptoavidina-Peroxidase. Barras (A) Barra = 32µm ; (B,C,D,E,F) (Barra = 16µm). FL (Folículo Linfóide); PB (Polpa Branca); PV (Polpa Vermelha); AC (Arteríola Central); TE (Trabécula Esplênica). ..... 50
- Figura 8** – Cortes histológicos parafinados de baço de cães controle e naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: (A) Cão controle: Observar a espessura de cápsula de acordo com a seta dupla; (B) Cão Sintomático: Notar um evidente espessamento da cápsula (seta dupla), sendo essa formada por fibras colágenas (reticulares) espessadas e dispostas em várias direções (seta larga). Prata Amoniacal de Gomori. (A) Barra= 64µm; (B) Barra = 16µm. .... 52
- Figura 9A-D**: Cortes histológicos parafinados de baço de cães controle (A) e cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (B,C,D): (A): Cão Controle. Notar delicada rede de fibras reticulares (setas). (B):Cão assintomático: Fibras colágenas mais proeminentes podem ser observadas (setas); (C,D) Cão sintomático: Fibras reticulares espessadas e mais evidentes podem ser observadas (setas). Prata Amoniacal de Gomori. Todas as Barras = 16µm. .... 55
- Figura 10A-D** – Cortes congelados de baço de cães controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. (A) Cão Controle: Expressão da laminina em células da polpa vermelha (setas). (B): Cão Assintomático: Presença de laminina em estruturas vasculares na polpa vermelha; (C,D) Cão Sintomático: Presença de forte marcação em células da polpa vermelha em relação ao controle (A) (setas). Estrepto-avidina-peroxidase para marcação da laminina. (AC) Arteríola Central Todas as Barras = 50 µm..... 58
- Figura 11A-C**: Cortes congelados de baço de cão controle (A) e de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (B,C): (A) Cão Controle: Presença discreta de fibronectina no parênquima do baço (polpa vermelha) ; (B) Cão Assintomático: Observar forte marcação positiva para fibronectina no parênquima esplênico no centro inferior da figura.; (C) Cão Sintomático: Marcação exuberante e difusa no parênquima esplênico. Imunofluorescência para detecção de fibronectina Todas as Barras 50=µm..... 61

- Figura 12A-F** Cortes histológicos parafinados de linfonodos cervicais de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: (A,B) Cão Assintomático: (A) Observar cápsula espessada (setas), seios subcapsulares com células inflamatórias (cabeças de setas) e região da cortical exibindo folículos linfóides; e em (B) Presença de inúmeras formas amastigotas na espessura da cápsula (setas); (C,D,E,F) Cão Sintomático: (C) Visão panorâmica da região da medular exibindo hipertrofia e hiperplasia das células dos cordões e dos seios. Em (D) detalhe da figura anterior mostrando predominância de plasmócitos (setas grandes), macrófagos (cabeças de seta) e linfócitos (setas pequenas). Em (E) observar macrófagos hipertróficos com núcleos vesiculosos e citoplasma abundante; e em (F) Macrófagos parasitados nos cordões (setas grandes) e seios (setas pequenas). (A,C) Hematoxilina-Eosina. Barras = 32µm ; (B,F) Estreptoavidina-imunoperoxidase. Barra = 16µm; (D,E) Barra = 16µm. C (Cápsula); SS (Seios Subcapsulares); FL (Folículo Linfóide); CM (Cordões Medulares); SM (Seios Medulares); VS (Vasos Sanguíneos)..... 65
- Figura 13A-D:** Cortes histológicos parafinados de linfonodo cervical de cães controle (A) e cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (B,C,D): (A): Cão Controle. Notar delicada rede de fibras reticulares (setas) na região da cortical. (B,C,D):Cão sintomático: (B) Fibras colágenas mais proeminentes podem ser observadas (setas) na região da cortical; Em (C) Cápsula com fibras reticulares espessadas e bem evidentes podem ser observadas (seta), e em (D) fibras reticulares evidenciadas nos seios (cabeças de setas) e cordões (setas) medulares. Prata Amoniacal de Gomori. Todas as Barras = 16µm. .... 68
- Figura 14A-D:** – Cortes congelados de linfonodo cervical de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A,B) Cão Assintomático: Imunomarcção da laminina em células da região subcapsular (setas) e em células da parede dos vasos (cabeças de seta). (C,D): Cão Sintomático: (C) Observar inúmeras células marcadas na região da subcapsular e cortical (seta), (D) Detalhe da figura anterior evidenciando a forte expressão de laminina (setas) Estrepto-avidina-peroxidase. (FL) Folículo Linfóide; (VS) Vasos Sanguíneos; (CC) Camada Cortical; (CM) Camada Medular Barras = 50 µm ..... 72
- Figura 15** – Imunofluorescência para detecção de FN no Linfonodo cervical. A - Cão controle. B - Fibronectina no linfonodo cervical de cão assintomático. C - Fibronectina em linfonodo de cão sintomático. .... 75
- Figura 16** – Cortes histológicos congelados de fígado, baço e linfonodo de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Expressão celular de CR3 (CD11b) no nas células sinusoidas (macrófagos); (B) Expressão celular de CR3 (CD11b) na polpa vermelha (macrófagos); (C) Expressão celular de CR3 (CD11b) nos cordões e seios medulares (macrófagos). Estrepto-avidina-peroxidase. Todas as Barras = 16µm..... 77

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

CR – Receptor do complemento  
CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal  
CCZ – Centro de Controle de Zoonoses  
HSC – Célula estelada hepática  
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
Gp63 – Glicoproteína 63  
IgG – Imunoglobulina G  
LDU – *Leishman Donovan Units*  
MEC/ECM – Matriz Extracelular  
FN – Fibronectina  
LN - Laminina  
LPG – Lipofosfolingano  
GAG - Glicosaminoglicana  
LV – Leishmaniose Visceral  
LVC – Leishmaniose Visceral Canina  
LVH – Leishmaniose Visceral Humana  
SMM – Sistema Monocítico Mononuclear  
TGO – Aminotransferase Alcalina  
TGO – Aminotransferase de aspartato  
ALP – Fosfatase Alcalina  
TGF – Fator de Crescimento Transformante  
MMP – Metaloproteinase de Matriz  
TIMP – Inibidor Tecidual de Metaloproteinase  
PDGF – Fator de Crescimento derivado de Plaquetas  
WHO - World Health Organization

## REGRAS GERAIS PARA DEFESA DE TESE

---

### 8.3. Condições para Defesa de tese/dissertação

O aluno de **doutorado** somente poderá defender seu trabalho final se tiver pelo menos um trabalho relacionado à tese **aceite** para publicação em periódico Qualis A Nacional ou superior e **mais um artigo submetido** para publicação.

Os alunos de **mestrado**, independentemente de seu ingresso no doutorado deverão ter pelo menos um trabalho relacionado à sua dissertação **enviado para publicação** ou já publicado em periódico Qualis A nacional ou superior.

### 8.4. Defesa de tese / dissertação

Concluído o trabalho final e obtidos todos os créditos necessários, o aluno deve entregar na Secretaria sete exemplares da tese de doutorado ou quatro exemplares da dissertação de mestrado, **contendo a ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina (opcional nesta etapa)**.

Para cumprimento de todas as providências acadêmico-administrativas e definição da Comissão Examinadora, os exemplares devem ser entregues na Secretaria do curso no mínimo 30 dias antes da data da defesa. A Secretaria encaminhará o trabalho final para os examinadores definidos pelo Colegiado.

A defesa será pública e se fará perante Comissão Examinadora indicada pelo Colegiado e aprovada pela Câmara de Pós-Graduação. No caso de tese, a Comissão é formada por cinco membros titulares (dois deles externos aos quadros da UFMG) e dois suplentes (um deles externo à UFMG), todos com título de doutor. No caso de dissertação, a Comissão é integrada por três membros titulares e um suplente, todos com título de doutor. Em ambos os casos, o orientador é membro nato da Comissão e preside a sessão pública.

Será considerado aprovado na defesa de tese/dissertação o aluno que obtiver aprovação **unânime** da Comissão Examinadora. Não será conferida nota nem conceito ao trabalho apresentado.

Aprovado o trabalho final, o aluno, juntamente com o orientador, deverá fazer as modificações cabíveis sugeridas pelos examinadores. Para expedição do diploma, o aluno deverá pagar a taxa correspondente e entregar os documentos exigidos (relação disponível na Secretaria), entre eles um exemplar da versão definitiva da tese/dissertação **contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina (sem encadernação)**. O curso custeará quatro cópias xerox encadernadas, três das quais serão encaminhadas pelo Centro de Pós-Graduação aos órgãos da Universidade e uma cópia será entregue ao aluno. O curso só custeará as cópias àqueles alunos que entregarem a versão final de sua tese/dissertação até um mês após a data da defesa.

**Só será fornecido ao aluno o comprovante de conclusão do curso após a entrega, na secretaria, de toda a documentação necessária para a expedição do diploma.**

## RESUMO

---

Este trabalho teve como objetivo estudar as alterações da matriz extracelular em fígado, baço e linfonodos cervicais em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* correlacionando estes achados com os aspectos clínicos, histopatológicos, parasitológicos e imunológicos. Para este estudo foram utilizados 30 cães, divididos em três grupos: dez animais não infectados (grupo controle) e vinte animais infectados. Todos sem raça e idade definidas, provenientes da região do Município de Sabará/MG e de Belo Horizonte/MG. Os animais infectados foram divididos em dois grupos: grupo denominado assintomático composto por dez animais que não apresentavam sinais clínicos da doença; grupo denominado sintomático: composto por 10 animais que apresentavam sinais clínicos clássicos da doença como lesões de pele (alopecia, eczemas, seborréia, ulcerações), perda de peso e linfadenopatias. Foram coletados em necropsia, fragmentos de baço, fígado, linfonodos cervicais, fixados em solução de formol a 10% tamponado e em seguida processados pelas técnicas rotineiras de histopatologia. Cortes parafinados dos diversos tecidos foram corados pela Hematoxilina e Eosina (H&E); Prata amoniacal de Gomori, para marcação das fibras reticulares e pela técnica imuno-histoquímica da estreptoavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas de *Leishmania*. Os cortes dos mesmos tecidos foram criopreservados e corados pela técnica imuno-histoquímica estrepto-avidina-peroxidase para marcação de laminina (LN) e imuno-histoquímica de imunofluorescência a qual foi utilizada para marcação da fibronectina (FN) tecidual. As análises morfométricas foram feitas utilizando o programa KS300 e o pelo sistema de análise de imagens Kontron Elektronik/Carl Zeiss, Germany. Os resultados mostram que há um aumento significativo da deposição de fibras colágenas no fígado, baço e linfonodos cervicais dos animais infectados quando comparadas aos animais controles, revelando diferenças significativas entre os animais sintomáticos e assintomáticos. Foram encontradas correlações positivas entre a presença do parasitismo tecidual e a deposição de colágeno no fígado, baço e na região medular dos linfonodos cervicais dos animais infectados. De fato, animais sintomáticos apresentaram uma maior deposição de colágeno nestes órgãos que pode estar associado ao maior parasitismo tecidual encontrado. A expressão das fibras adesivas laminina (LN) e fibronectina (FN) no fígado, baço e linfonodos cervicais foi também mais elevada nos animais infectados, principalmente, no grupo de animais sintomáticos. Não houve diferença estatística significativa quando comparamos a expressão de LN no baço e linfonodos cervicais entre os grupos de animais sintomáticos e assintomáticos, mas a expressão de FN foi significante estes grupos. Nossos resultados demonstram que na leishmaniose visceral canina há uma fibrogênese no fígado, baço e linfonodos, associada ao parasitismo tecidual e a processos degenerativos.

## ABSTRACT

---

The aim of this work was study the extracellular matrix alterations in liver, spleen and cervical lymph nodes in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* correlating with clinical aspects, histological, parasitological and immunological. This study was carried out with 30 dogs, divided at three groups: ten not infected animals (group control) and twenty infected animals. All them was mongrel dogs with undefined age, obtained from the municipality of Belo Horizonte, MG, metropolitan area. Infected animals were divided in two groups: asymptomatic group composed by ten animals without clinical signs of the disease; group denominated symptomatic: composed by ten animals with classical clinical signals of the disease as skin lesions (alopecia, eczemas and ulcers), loss weight and lymphopathy. During necropsy, spleen, liver and cervical lymph nodes fragments were collected and fixed in buffer formaldehyde solution to 10% for histological analyses. Paraffined sections of the tissues were stained by Hematoxylin-Eosin (HE); Gomori's Ammoniacal Silver staining for reticular fibers and strepto-avidin peroxidase Immunohistochemical method for tissue *Leishmania* amastigotes detection. Frozen tissue sections of organs were stained by strepto-avidin peroxidase Immunohistochemical method for laminin (LN) tissue characterization and immunofluorescence technique for fibronectina (FN). The tissue images were transferred to a computer video screen by means of the software KS300 and relayed to a computer-assisted image analysis system (Kontron Elektronik/Carl Zeiss, Germany) for morphometrical analysis. Significant increase collagens deposition in liver, spleen and cervical lymph nodes of infected dogs when compared to controls animals. There was significant difference between symptomatic and asymptomatic dogs collagen deposition in organs. Positive correlation between the parasite load and collagen deposition in liver, spleen and cervical lymph nodes of infected animals. In fact, symptomatic animals showed increase collagen deposition in these organs, it's can be associate to parasite burden. Adhesive fibers LN and FN expression in liver, spleen and cervical lymph nodes was higher in symptomatic animals than in asymptomatic. No significant statistical difference when we compare LN expression in the spleen and cervical lymph nodes between symptomatic and asymptomatic groups. While in all organs studied of infected animals FN expression demonstrated significant differences in these groups. Our results demonstrate that in canine visceral leishmaniasis induces fibrogenesis in liver, spleen and lymph nodes attached the parasite load and degenerative processes.



# 1 - INTRODUÇÃO

---

## 1.1 - Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, à família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903; SUNDAR & RAI, 2002). Esses parasitos possuem ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados, na forma amastigota e em insetos vetores - dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo e *Phlebotomus* – no Velho Mundo, na forma promastigota (LAINSON et al., 1987; KILLICK-KENDRICK, 1990).

Agrupam-se no gênero cerca de 30 espécies, sendo aceito que, aproximadamente 21 tenham a capacidade produzir alterações patológicas na espécie humana (Herwaldt, 1999; Ashford, 2000). As leishmanioses incluem várias doenças que são determinadas pela espécie do parasito e das interações entre esses parasitos e seus hospedeiros. De fato, no homem a doença manifesta-se em formas clássicas descritas como a leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa, cutânea disseminada, cutânea difusa, a dérmica pós-calazar e a leishmaniose visceral (ASHFORD, 2000).

O ciclo biológico do parasito inicia-se no momento em que fêmeas do inseto vetor, ao fazerem o repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingerem macrófagos-monócitos contendo amastigotas. Essas amastigotas, na luz do trato digestivo, diferenciam-se em formas flageladas denominadas promastigotas procíclicas. As formas promastigotas multiplicam-se por divisão binária no trato digestivo do inseto e possuem uma camada de moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, consistindo de um núcleo glicana, uma âncora lipídica altamente conservada e unidades variáveis de oligossacárides. Interações envolvendo LPG com lectinas e moléculas tipo lectinas presentes no intestino do inseto, impedem que as formas promastigotas procíclicas sejam eliminadas juntamente com o bolo alimentar. Durante a metaciclo-gênese, essas formas sofrem uma extensa modificação estrutural, envolvendo o tamanho e a expressão de açúcares de LPG,

transformando-se em promastigotas metacíclicas. A expressão de grande quantidade de LPG, bem como de outros glicoconjugados, como a metaloprotease - gp63, na superfície do parasito é capaz de protegê-lo da ação das enzimas hidrolíticas presentes no intestino do flebotomíneo (KILLICK-KENDRICK, 1990; ALEXANDER et al., 1999). As promastigotas metacíclicas apresentam reduzida afinidade de ligação às lectinas, levando ao seu desligamento do epitélio intestinal e migração para a probóscida do inseto. Durante o próximo repasto sangüíneo, a forma infectiva é passada para o hospedeiro vertebrado, sendo então internalizada pelos macrófagos, processo este, mediado por receptores (CUNNINGHAM, 2002; De ALMEIDA, 2003). As promastigotas são incorporadas em fagolisossomas, onde se diferenciam em formas amastigotas. Dentro das células do sistema monocítico-mononuclear (SMM) as amastigotas multiplicam-se por divisão binária. O processo ininterrupto de divisão rompe, eventualmente, o macrófago infectado liberando as amastigotas, que são capazes de infectar novas células. O flebotomíneo, ao fazer novo repasto sangüíneo, ingere os macrófagos infectados, perpetuando, assim, o ciclo.

A Organização Mundial de Saúde estima que a incidência anual da doença seja em torno de 12 milhões de casos em todo o mundo e que 350 milhões de pessoas apresentam o risco de adquirir uma das formas da doença. Por esta razão, as leishmanioses encontram-se entre as seis doenças infecciosas tropicais de grande importância na Saúde Pública (DESJEUX, 2004).

Em humanos, a infecção causada por *Leishmania* resulta em doença de amplo espectro dependendo da espécie envolvida e da eficiência da resposta imune do hospedeiro contra o parasito (TURK & BRYCESON, 1971). Dentre as formas clínicas de apresentação reconhecidas, a Leishmaniose Visceral (LV) é a mais grave, progressiva e quase sempre fatal quando não tratada (BRYCESON, 1996).

## 1.2 - Leishmaniose Visceral Humana (LVH)

A leishmaniose visceral ocorre em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo, distribuída em todos os continentes, a exceção da Oceania e Antártica, onde apresenta aspectos epidemiológicos variados (WHO, 2007). A leishmaniose visceral humana (LVH) também conhecida como calazar pode ser causada por três espécies do parasito. A espécie *L. (Leishmania) donovani* (LAVERAN & MESNIL, 1903) é responsável pela doença na Índia, Paquistão, China Oriental, Bangladesh, Nepal, Sudão e Kênia. Nestas regiões o homem atua como reservatório do parasito tendo a doença um perfil antroponótico (TAVARES et al., 2003). Já a espécie *L. (L.) infantum* (NICOLLE, 1908), agente etiológico da leishmaniose visceral na Ásia Central e sudoeste, nordeste da China, norte da África e Europa Mediterrânea tem caráter zoonótico. No Novo Mundo a espécie *L. (L) chagasi* (CUNHA E CHAGAS, 1937) é o agente da leishmaniose visceral que apresenta, também, caráter zoonótico. Estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e *L. infantum* como sendo uma única espécie (MAURÍCIO et al., 2000). Shaw (2006) sugere o uso do nome *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* para o agente etiológico da leishmaniose visceral americana. Como não existe ainda um consenso a respeito desse assunto, neste trabalho optou-se pela denominação *L. chagasi* ao parasito em questão, por se tratar de estudo realizado no Brasil.

As estimativas mundiais, em relação à leishmaniose visceral, indicam que cerca de 200 milhões de pessoas encontram-se sob risco de adquirir a infecção e que 500 mil pessoas se infectam a cada ano. No ano de 2000 foram estimadas, na população mundial, 41 mil mortes causadas pela doença (GUERIN, et al., 2002). Aproximadamente 90% dos casos mundiais de LVH estão notificados em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (GUERIN, et al., 2002; WHO, 2004).

A emergência da leishmaniose visceral, como um crescente problema de Saúde Pública, deve-se principalmente a fatores demográficos e ecológicos. Na América Latina a leishmaniose visceral está presente em locais onde anteriormente não ocorria. Na América do Sul, especialmente no Brasil, Colômbia e Venezuela, a migração e urbanização contribuem fortemente para

o aumento da doença. As precárias condições sanitárias e nutricionais da população migrante, a presença de animais domésticos, atuando como reservatórios do parasito e fonte alimentar para os flebotomíneos, no domicílio e peridomicílio, além da capacidade de adaptação do vetor ao ambiente urbano são fatores fundamentais no estabelecimento e expansão da doença (WHO, 2004).

No Brasil, a incidência de LVH aumentou de 1977 casos em 1998 para 3624 casos em 1999 chegando a 4858 casos em 2000. (BRASIL - Ministério da Saúde, 2006). Entretanto, após este período, observou-se uma diminuição na incidência de LVH no país, com 3203 casos em 2005. A leishmaniose visceral tem maior taxa de incidência nas regiões Nordeste e Norte, tendo crescido em todas as regiões (com exceção da região Nordeste) no período de 1990 a 2005, o que sugere que a doença encontra-se em expansão. Em número de casos, a região Nordeste concentrou na década de 1990 a 2000, quase 90% dos casos do Brasil. Esta participação tem diminuído na década atual, chegando a 55% de casos da doença, seguida pelas regiões Sudeste (21,5%) e Norte (15,9%), em 2005. O aumento do número de casos nas demais regiões tem limitado a queda das taxas nacionais. (BRASIL- Ministério da Saúde, 2006).

Em Belo Horizonte – Minas Gerais, o número de casos de leishmaniose vem crescendo a cada ano (MARGONARI et al., 2006). Em 2006 foram relatados 113 casos de LVH com 10 óbitos e 8000 casos de leishmaniose visceral canina (Secretaria Municipal de Saúde - Belo Horizonte, 2007).

### **1.3 - Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**

Do ponto de vista epidemiológico, a leishmaniose visceral canina (LVC) tem sido considerada mais importante do que a doença humana, visto que tem a maior prevalência e muitos animais assintomáticos de áreas endêmicas têm sido detectados com parasitos na pele (MARZOCHI et al., 1985). Um estudo realizado em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* na Espanha, concluiu-se que animais assintomáticos foram igualmente infectantes para os vetores (MOLINA, 1994).

Estudos pioneiros realizados por Chagas et al. (1937 e 1938), na região Norte do Brasil, mostraram a existência de cães naturalmente parasitados nos mesmos locais onde ocorria a infecção humana. Todavia, a leishmaniose canina no Brasil só teve relevância quando foi estudada em uma área de grande endemicidade: o nordeste brasileiro. No Ceará, Deane (1955), em estudo comparativo entre a infecção humana e canina, encontrou *Leishmania* na pele de 16,3% dos indivíduos e em 77,6% dos cães naturalmente infectados. Além disso, verificou que a infecção experimental de flebotomíneos era mais freqüente e intensa quando os insetos se alimentavam em cães (75%) do que em pacientes humanos (28,5%). Estas observações, bem como as de outros trabalhos que têm estudado a doença canina em áreas endêmicas de LVH, mostram o cão como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos (MARGONARI et al., 2006). Isto se deve a alta prevalência da doença no animal nessas regiões e pela presença do parasito na sua pele, o que favorece a infecção do inseto vetor e, conseqüentemente, a transmissão ao homem (BRENER, 1957; ALENCAR, 1959; DEANE & DEANE, 1962; IVERSSON et al., 1983; MARZOCHI, et al., 1985).

Os cães são considerados os principais mantenedores e disseminadores da *L. chagasi* no meio urbano. A LVC caracteriza-se por apresentar um largo espectro de lesões que variam desde a infecção clínica silenciosa até uma forma clínica manifesta, levando o animal à morte. Os principais sinais clínicos da LVC são: (1) lesões cutâneas que compreendem a seborréia, alopecia generalizada ou localizada preferencialmente ao redor da órbita ocular denominada “máscara leishmaniótica”, ulcerações e a onicogribose; (2) linfadenopatia caracterizada pela hipertrofia dos linfonodos tornando-os facilmente palpáveis clinicamente, como os cervicais e poplíteos; (3) hepatoesplenomegalia; (4) perda de peso progressiva (caquexia); (5) edema das patas; (6) lesões oculares como a opacidade córnea e a blefarite (LONGSTAFFE & GUY, 1995; FERRER, 1992; CIARAMELLA et al., 1997; LIMA et al., 2004; XAVIER et al., 2006).

A *L. (L.) chagasi* e/ou *L. (L.) infantum* são conhecidas como causadoras da forma visceral em seres humano e em cães, todavia os cães além de manifestarem a forma visceral podem desenvolver vários tipos diferentes de lesões cutâneas, que variam desde alopecia até a formação de

úlceras semelhantes às aquelas apresentadas pelo homem nos casos de leishmaniose cutânea (FERRER et al., 1986). A presença de parasitos (formas amastigotas), principalmente na derme superficial da pele (MOURA et al., 2008) serve como fonte para o vetor, que se infecta ao picar o animal doente e, posteriormente inocula a forma promastigota na epiderme ou derme superficial do homem e cães sadios (PINELLI et al., 1994, DA COSTA-VAL et al., 2007 MICHALSKY et al., 2007).

### **1.3.1 – Aspectos clínicos e patológicos da LVC**

O espectro patológico da LVC é muito diverso devido às diferenças na relação parasito-hospedeiro em consequência das variações na resposta imune individual do hospedeiro. São várias as formas clínicas (aguda, subaguda e crônica, assintomáticas e sintomáticas), sendo que o período de incubação é incerto, podendo variar de três meses até vários anos (GENARO, 1993). Assim, os sinais clínicos e o tempo de aparecimento da doença são variáveis oscilando entre ausência total de sinais até uma síndrome clínica caracterizada por febre, descamação e eczema, principalmente no focinho e orelha, pêlo opaco e ulcerações leves localizadas freqüentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações, úlcera de decúbito. Com grande freqüência observa-se, nas fases mais adiantadas da doença, esplenomegalia, alopecia generalizada, ulcerações mais acentuadas na pele, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, melena ou hematoquesia, edema das patas, vômito, além do aparecimento de áreas de hiperqueratose especialmente na ponta do focinho. Na fase final da infecção ocorrem, em geral, paraparesia, caquexia, inanição e óbito do animal (DEANE & DEANE, 1955; ALENCAR, 1959; SLAPPENDEL & GREENE, 1990; GENARO, 1993; CIARAMELLA, 1997; ALVAR, 2004; DA COSTA VAL et al, 2004).

As principais lesões da leishmaniose visceral, observadas em cães no Velho e Novo Mundo, ocorrem em órgãos ricos em células do sistema monocítico mononuclear como o baço, fígado, linfonodos, medula óssea, rins, pulmões, intestinos e a pele (BOGLIOLO, 1956; ALENCAR, 1959; GENARO, 1993; TAFURI et al., 1996; TAFURI et al., 2001; LIMA et al., 2004).

O baço pode apresentar tamanho normal, discretamente aumentado ou hipertrofiado (FAURE-BRAC, 1933; DONATIEN & LESTOQUARD, 1935; ALENCAR, 1959). Neste órgão ocorre diminuição do número de linfócitos e proliferação de macrófagos na bainha linfóide periarteriolar, hiperplasia folicular e aumento da polpa vermelha com agregados de macrófagos e células plasmáticas (KEENAN et al., 1984; GENARO, 1993; TAFURI et al., 1996, SANTANA et al., 2007).

No fígado, observa-se infiltrado plasmolinfocitário e hiperplasia das células de Küpffer. Pode ocorrer uma hepatite difusa, reação inflamatória exsudativa com infiltrado linfoplasmocitário nos espaços portais e interlobulares além da presença de granulomas intralobulares com célula epitelioide parasitados ou não (GENARO, 1993; TAFURI et al, 1996; TAFURI et al, 2001; MELO et al., 2008).

Slappendel (1998) demonstrou em seus estudos que em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* ocorre um aumento da atividade sérica da Aminotransferase de alanina (ALT/TGP), da aminotransferase de aspartato (AST/TGO) e da Fosfatase Alcalina (ALP), observados em 82% dos casos. Estas alterações foram atribuídas aos severos danos hepáticos que ocorrem leishmaniose canina (Ferrer, 1991). A maior quantidade da TGP é encontrada nos hepatócitos de cão, gato, rato e coelho. É considerada específica para lesão hepática nestes animais. Seu aumento no soro está relacionado com lesão hepática de natureza inflamatória, tóxicas e degenerativas. Os níveis de sua elevação dependem do grau e duração da lesão. A TGO está localizada no hialoplasma e nas mitocôndrias das células. É a enzima de eleição para indicação de lesões hepáticas em animais, principalmente nos de grande porte.

Nos linfonodos, o aumento do número e tamanho dos folículos linfóides e a marcante hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos medulares (cordões e seios) justificam a linfadenopatia observada clinicamente (LIMA et al., 2004; COSTA et al., 2008).

A medula óssea encontra-se hiperplásica, podendo ou não conter parasitos (KEENAN et al, 1984).

Na pele, observa-se processo inflamatório de células mononucleares (macrófagos, plasmócitos e linfócitos) com graus variados de intensidade podendo apresentar-se distribuído ao redor dos anexos ou difusamente na



derme (SANTOS et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2006; XAVIER et al., 2006). Acantose, hiperkeratose com presença ou não de pérolas córneas, parakeratose e degenerações celulares são alterações histopatológicas comumente observadas na leishmaniose visceral canina.

O envolvimento renal, glomerulonefrite causada pela deposição de imunocomplexos, é freqüente e os sinais clínicos apenas se tornam evidentes quando a lesão renal já é grave. Em alguns casos a insuficiência renal é o único sintoma observado e nestes casos o óbito pode ocorrer em poucos dias (MARCUSSEN et al., 1989; NIETO et al., 1992; TAFURI et al., 1996; FONT & CLOSA, 1997; CIARAMELLA et al, 1997; TAFURI et al., 2001).

Nos pulmões ocorre pneumonite intersticial crônica com espessamento dos septos inter-alveolares (TRYPHONAS et al, 1977; ANDERSON, 1980; DUARTE et al, 1986; GONÇALVES, 2003).

No intestino a hiperplasia linfóide das placas de Payer, associada ou não ao parasitismo, pode ocorrer nos intestinos delgado, jejuno e íleo, grosso, ceco e cólon (TOMÉ 1956; BRENER, 1957; KEENAN et al, 1984; SILVA et al, 2001).

#### **1.4 - Interação *Leishmania* hospedeiro vertebrado**

A interação *Leishmania*-macrófago envolve mecanismos complexos, dependentes de fatores múltiplos dos hospedeiros vertebrados e invertebrados, bem como do próprio parasito. O sucesso da infecção em ambos os hospedeiros não ocorre ao acaso. De acordo com Killick-Kendrick (1979), os vetores dos parasitos do gênero *Leishmania* são espécie-específicos, bem definidos e variações nas moléculas de superfície dos protozoários facilitam o sucesso da infecção no vetor apropriado (SCHLEIN, 1993). O hospedeiro vertebrado, por sua vez, possui mecanismos de defesa que são ativados na presença do parasito. Sabe-se que os macrófagos são as células hospedeiras primárias das promastigotas, o que significa que esses parasitos possuem mecanismos de adaptação aos fatores hostis do hospedeiro, antes, durante e após sua internalização na célula (RUSSEL & TALAMAS-ROHANA, 1989; OLIVIER et al., 2005).

Durante o repasto sangüíneo, a fêmea hematófoga (vetor) introduz a proboscida no hospedeiro vertebrado dilacerando proteínas estruturais da matriz intersticial, inclusive atingindo a parede de pequenos vasos sangüíneos, promovendo lesões hemorrágicas. A formação dessas lesões decorre tanto da ação mecânica da proboscida, quanto da ação da saliva do inseto. De fato, componentes da saliva como maxadilán - potente agente vasodilatador e imunomodulador, adenosina, prostaglandinas, dentre outros, auxiliam o vetor na aquisição do sangue. Por outro lado, ocorre a ativação de mecanismos de defesa natural, no hospedeiro, como o sistema do complemento, trombina, plaquetas, anticorpos naturais, fagócitos, dentre outros (RIBEIRO et al., 1987; GILLESPIE et al., 2000). A sobrevivência do parasito, na sua forma infectante, é fortemente influenciada pelos elementos presentes nesse microambiente tecidual.

Os macrófagos contêm, em sua superfície, um complexo arranjo de receptores capazes de mediar a ligação de uma ampla diversidade de ligantes. Dentre eles deve-se destacar os receptores pertencentes à família das integrinas  $\beta 2$  que parecem ter importância fundamental na interação *Leishmania*-macrófagos (TALAMAS-ROHANA et al., 1990; MOSSER & ROSENTHAL, 1993; CUNNINGHAM, 2002; HANDMAN & BULLEN, 2002; De ALMEIDA et al., 2003).

As integrinas são moléculas de adesão cujas funções envolvem interações célula-célula ou célula-matriz extracelular, fundamentais para a ativação leucocitária (SPRINGER, 1990; PATARROYO et al., 1990). As integrinas  $\beta 2$  específicas de leucócitos (CD11/CD18), consistem de três heterodímeros com cadeias  $\alpha$  específicas (CD11a,b,c) e uma cadeia  $\beta$  comum (CD18).

A integrina CD11b/CD18, conhecida como receptor para o terceiro fator do complemento (CR3) ou MAC-1, é um receptor heterodimérico expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células natural killer, sendo que a sua expressão antigênica é especificamente maior durante a maturação monocítica. A função do CR3 foi inicialmente descrita como a habilidade de se ligar à forma inativa do complemento C3bi, mediando desta forma, a fagocitose e lise de eritrócitos opsonizados com este fator, além de aumentar a atividade

das células natural killer contra células alvos opsonizadas com C3bi (ROTHLEIN & SPRINGER, 1985; RAMOS et al., 1988).

A ligação *Leishmania*-macrófagos pode se dar, portanto, de maneira direta ou indireta, envolvendo moléculas específicas, já mencionadas, presentes na superfície de ambos, que estimulam o processo de internalização (CHANG, 1979).

Na interação direta, moléculas do parasito ligam-se aos receptores presentes na superfície dos macrófagos: LPG liga-se aos receptores CR3 e CR4 (TALAMAS-ROHANA et al., 1990); gp63 liga-se ao receptor CR3 (RUSSEL & WRIGHT, 1988) e alguns carboidratos ligam-se aos receptores de manose e fucose (MOSSER, 1993).

Na interação indireta, a opsonização do parasito, com os elementos presentes no soro do hospedeiro como imunoglobulinas, fibronectina e fatores do complemento, facilita sua internalização, através da ligação com receptores específicos presentes no macrófago, mediando assim, a sobrevivência da *Leishmania*. Dentre os receptores de macrófagos deve-se ressaltar aqueles pertencentes à família das integrinas  $\beta 2$ , em especial o receptor CR3 (MOSSER, 1993; KANE & MOSSER, 2000).

A importância dos receptores CR3 na LVC tem sido demonstrada por Gonçalves et al., (2005) e Sampaio et al., (2007). De fato, esses autores trabalhando com monócitos circulantes e macrófagos peritoneais de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* demonstraram uma maior internalização de promastigotas de *L. chagasi*, além da maior sobrevivência de amastigotas em sistemas "in vitro", associado à análise por citometria de fluxo.

### **1.5 - Alterações da Matriz Extracelular (MEC)**

A matriz extracelular (MEC) é um complexo estrutural que cerca e apóia as células encontradas nos tecidos. A MEC é referida geralmente como tecido conjuntivo. É composta principalmente por glicosaminoglicanas (GAGs) que formam grandes agregados através de ligações com proteínas, compostos por três classes maiores de biomoléculas: (1) as proteínas estruturais constituindo o colágeno e elastina; (2) as proteínas especializadas ou moléculas adesivas formadas pela fibronectina, laminina e fibrilina as quais

funcionam como moléculas de adesão através de ligações específicas para GAG e (3) outras proteínas da matriz e moléculas de superfícies de células, o que a permite exercer importantes funções relacionadas à adesão, migração ou reconhecimento celular do micro ambiente e das proteoglicanas (GAGs sulfatadas que ao estabelecerem ligações covalentes com um núcleo de proteína). As proteoglicanas por sua vez formam uma família de macromoléculas constituída por uma proteína central a qual se adere à cadeia longa de dissacarídeos repetidos denominado de glicosaminoglicanas (GAGs) formando componentes complexos de alto peso molecular da MEC. Muitas proteoglicanas, especialmente a agrecana (encontrada na cartilagem e no tecido conjuntivo propriamente dito), ligam-se ao ácido hialurônico (RHOADS & FETTERER, 1997).

As GAGs são polissacarídeos não flexíveis e não ramificados que dividem-se em dois grupos: (1) as não sulfatadas (ácido hialurônico), uma macromolécula muito grande que não forma ligações covalentes com moléculas de proteínas, e (2) as sulfatadas (queratan sulfato, heparan sulfato, heparina, dermatan sulfato e os sulfatos de condroitino-4 e sulfato de condroitino-6) (MARTIN et al., 1985).

Além disso, as moléculas multifuncionais presentes na matriz têm a capacidade de interagir com vários outros componentes, apresentando em especial uma afinidade pelos fatores de crescimento e receptores celulares. A adesão de microorganismos à superfície da célula do hospedeiro é um passo importante para o estabelecimento de uma infecção e normalmente esta adesão é mediada por proteínas de superfície ou adesinas (BEACHEY, 1981). A maior parte das interações envolve as proteínas da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro. Isto ocorre graças ao *turnover* celular, injúrias ou agentes invasores (WESTERLUND & KORHONEN, 1993).

Pesquisas têm mostrado que certas enzimas como as metaloproteinases podem modificar a função da matriz extracelular não somente pela degradação de proteínas da matriz, mas também por afetarem fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão (YAMADA & KEMLER, 2002).

Estudos recentes mostram a ocorrência de alterações de MEC em lesões cutâneas e em linfonodos drenantes, causadas por *Leishmania (L.)*

*amazonensis* em diferentes linhagens de camundongos (ABREU-SILVA et al., 2004).

A formação e a degradação da matriz extracelular são processos dependentes e balanceados do mesmo tipo de célula. O excesso de acúmulo de MEC que leva a fibrose ocorre quando a formação excede a degradação. Nas inflamações crônicas, em consequência comum das infecções parasitárias é um potente promotor de formação de matriz extracelular. Ao remover a causa, a inflamação é diminuída e a degradação do excesso intersticial predomina, resultando no remodelamento ou restabelecimento do parênquima o mais próximo do normal. Quanto mais jovem for a fibrose mais rapidamente esta pode ser degradada. O processo de degradação matricial também pode ocorrer em fibroses de longa duração, entretanto, a passos lentos (ANDRADE et al., 1991).

Segundo Cobertt et al., (1991), a completa resolução da fibrose intralobular difusa devido a leishmaniose visceral humana foi documentada através de biópsias tomadas sete dias e dois anos após tratamento quimioterápico para leishmaniose. As mudanças observadas na última biópsia consistiam no desaparecimento da fibrose intralobular, assim como da hiperplasia das células de Kupffer e do parasitismo.

A fibrose hepática ou a acumulação progressiva de matriz extracelular (MEC) fibrilar no fígado, é a consequência de danos teciduais repetidos devido à infecções (principalmente por vírus B e C), induzida por drogas, causas metabólicas e auto-ímmunes, e à ativação crônica da reação de cicatrização de feridas (SCHUPPAN *et al.*, 1999; ROCHEY, 2000; VALKOVA, 2002; PINZANI & ROMBOUTS, 2004). A fibrose hepática não resulta somente de mudanças na MEC, mas também de alterações na sua degradação, que significa uma perda do balanço funcional dinâmico entre fibrogênese e fibrólise (VALKOVA, 2002). Como o fígado torna-se fibrótico, há mudanças quantitativas e qualitativas na composição da ECM. As fontes celulares dos componentes do tecido conjuntivo em fibrose hepática têm sido um tema de controvérsia, mas as células hepáticas esteladas (HSC) ou células de Ito são provavelmente as que mais contribuem para esse processo, quando o dano hepatocelular é limitado ou concentrado dentro do lóbulo hepático (PINZANI & ROMBOUTS, 2004). Há

evidências têm sido obtidas que células precursoras circulantes, chamadas fibrócitos do sangue circulante migram para o sítio da lesão, mas ainda não foi demonstrado o seu papel no desenvolvimento de fibrose hepática (GUYOT et al., 2005).

Segundo Corbett et al., (1993) na leishmaniose visceral humana (LVH), além da ativação das células de Ito devido à estase e a persistência do antígeno, a estimulação crônica das células de Kupffer também estimularia uma reação intersticial no espaço de Disse, acompanhada da alta ativação dessas células estreladas. Além disso, o autor ainda discute se a presença de antígenos de *Leishmania* nos espaços de Disse e quanto de Imunoglobulina G (IgG), estimulariam a síntese e secreção de produtos da matriz.

Alguns autores como Andrade (1994); Rohey (2000) e Valkova, 2002 afirmam que a fibrogênese das células de Ito gira em torno da interação dessas células e outros componentes celulares do fígado, citocinas, peptídeos e a MEC. A própria MEC modula o estado de ativação das HSC, e proteínas degradantes da matriz. Dentre as citocinas envolvidas nesse processo, o fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) exerce um papel central (CLÉMENT et al., 1993; VALKOVA, 2002; SCHUPPAN et al., 2003; GUI et al., 2005), pois inicia a sinalização através de sua interação com receptores heterodiméricos tipo I e II na superfície das HSC, que propagam sinais através da fosforilação de mediadores citoplasmáticos, que irão ativar os genes que codificam o colágeno fibrilar (principalmente o colágeno tipo I e o colágeno tipo III). Além disso, o TGF- $\beta$  induz uma inibição (*down-regulation*) dos genes que codificam as metaloproteinases da matriz (MMP-1) e estimulam (*up-regulation*) o gene para inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP-1) (PINZANI & ROMBOUS, 2004; BHOGAL & BONA, 2005). Nesse contexto ainda, a proliferação das HSC é um importante componente da ativação da cascata, por amplificar a resposta à injúria, dentre outros fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal, fator de crescimento de fibroblastos, endotelina-1, trombina, TGF- $\alpha$ ) o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é o principal mitógeno e quimioatraente para HSC (ROCHEY, 2000; PINZANI & ROMBOUS, 2004; SHI et al., 2005).

### 1.5.1 - Sistema Colágeno

Os colágenos são as proteínas mais abundantes encontradas no reino animal, sendo as maiores proteínas constitutivas da MEC. O sistema colágeno é formado por vários tipos de colágenos geneticamente distintos que ocorrem em diferentes tecidos conjuntivos (VON DER MARK et al., 1976). Pelo menos vinte tipos de colágenos são conhecidos hoje. Todos os tipos de colágeno até agora descritos originam-se de uma molécula precursora denominada tropocolágeno, a qual é constituída por três cadeias polipeptídicas, que se enrolam entre si numa configuração estrutural de tríplice hélice. As moléculas de tropocolágeno dão origem às fibrilas colágenas, que por sua vez se dispõem paralelamente para formar fibras colágenas propriamente ditas (VON DER MARK et al., 1976).

O colágeno do tipo I representa o mais comum dos colágenos, forma fibras grosseiras e está presente no tecido conjuntivo propriamente dito, padrão normal da pele, tendão, osso, dentina e cemento. Já o tipo II de colágeno, forma fibras delgadas e está presente quase exclusivamente nas matrizes da cartilagem hialina e elástica. O colágeno do tipo III, freqüentemente associado ao tipo I, é denominado, também, de fibra reticular mais delgada. O colágeno do tipo IV não constitui fibras, estando presente nas lâminas basais, em que forma uma rede de moléculas de pró-colágeno mantidas unidas, e formando uma base de sustentação da lâmina basal. O colágeno do tipo V existe em pequena quantidade e origina fibrilas muito delgadas, sendo encontrado associado com o colágeno do tipo I, presente na maioria do tecido intersticial, assim como o colágeno do tipo VI. O colágeno do tipo VII constitui pequenos agregados conhecidos como fibrilas de ancoragem, onde também dão sustentação à lâmina basal para os feixes subjacentes de fibras colágenas do tipo I e do tipo II. O colágeno tipo XI é encontrado nas cartilagens hialina e elástica, participando da estrutura das fibrilas de colágenos, juntamente com o colágeno tipo II (MONTES, 1996).

Abreu-Silva et al. (2004) demonstraram em trabalhos com infecção experimental em camundongos com *L. amazonensis* que na pele houve

substituição do colágeno do tipo I pelo tipo III com o decorrer da infecção, com alterações da arquitetura normal deste órgão.

A ocorrência do colágeno tipo III também foi demonstrada em granulomas de camundongos infectados com *L. donovani* (GOSHI et al., 1999). Todavia Tafuri et al., (1996) descreveram histologicamente a presença de apenas alguns traços de colágeno do tipo III em granulomas de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*.

Lira et al. (1997) mostraram através de experimentos com formas promastigotas de *L. (L.) mexicana* que estas podiam se ligar ao colágeno tipo I, indicando que esta interação poderia ser importante na patogênese da infecção.

Estudos mostram que *Staphylococcus aureus* possui um receptor de superfície para o colágeno tipo II, expressão a qual parece ser um requerimento necessário e suficiente para a invasão da cartilagem na osteomielite ou artrite séptica (SWITALSKI et al., 1993).

Estudos de Gonçalves et al. (2003) trabalhando com cães naturalmente infectados com *L. chagasi* com pneumonite intersticial crônica, demonstrou-se a presença abundante de fibras reticulares (colágeno tipo III) no interior dos septos alveolares. As fibras reticulares foram intensamente coradas e formavam estruturas densas emaranhadas ou enoveladas denominadas pelos os autores como estruturas semelhantes a “tacos de golfe”. As fibras reticulares foram observadas com maior intensidade nas áreas onde o infiltrado inflamatório era mais intenso e onde o septo pulmonar apresentava-se mais espessado quando comparado com os pulmões dos animais controle normais. Os autores demonstraram ainda uma fibrogênese pulmonar significativa em relação aos animais assintomáticos.



### 1.5.2 - Fibronectina (FN)

A aderência é um pré-requisito para o estabelecimento e manutenção da população de patógenos nos hospedeiros mamíferos. O enfoque geral para entender os mecanismos de reconhecimento da célula hospedeira e a aderência pelo patógeno é baseada na consideração da interação inicial protéica. Através de vários estudos têm-se destacado o potencial papel de resíduos de açúcares como ligantes para a aderência de parasitos protozoários (JUNGERY, 1985; MARKWELL, 1980), em particular, no possível papel da fibronectina (FN) nas interações células-patógenos.

As fibronectinas são um grupo de glicoproteínas encontradas na forma solúvel no plasma, líquido cefalorraquidiano, líquido sinovial e amniótico, líquido seminal, na saliva e no exsudato inflamatório (MOSHER, 1984). A forma insolúvel está presente na superfície celular e na matriz extracelular, onde se liga a fibras diméricas através de ligações covalentes (PROCTOR, 1987a). A fibronectina é a mais abundante glicosaminoglicana (GAG) na matriz extracelular hepática, sendo encontrada nos septos, na tríade portal, espaço de Disse e localizada junto às fibras colágenas (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 1995)

A fibronectina promove aderência de célula-célula, aderência da célula ao plasma, célula à membrana basal e a outros componentes da matriz; estimula a migração das células endoteliais, favorecendo a neovasculogênese; orienta a deposição de outros componentes da matriz como colágeno, heparan sulfato, proteoglicanas, sulfato de condroitina (MOSHER, 1984); aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos, uma vez que induz a quimiotaxia e a adesão do fagócito ao patógeno (PROCTOR, 1987b).

Fibronectina é considerada como um componente chave em vários processos biológicos (WYLER, 1987). Essa possui domínios funcionais que facilitam interações com células, heparina, fibrina, colágeno, imunoglobulinas e também com parasitas (WYLER, 1985).

A aderência à célula hospedeira é particularmente importante para aqueles parasitas com uma fase de crescimento e multiplicação intracelular. Existem grandes evidências em que a fibronectina poderia exercer um papel importante na adesão e ligação de parasitas nas células hospedeiras, incluindo

a ligação entre as formas promastigotas de *Leishmania* e macrófagos hospedeiros. (BLACKWELL et al., 1984). Estudos mostram, por exemplo, que a FN tem um papel importante em certas doenças parasitárias. *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* prendem-se à FN do hospedeiro facilitando sua associação com as células de seus parasitos (WYLER et al., 1987). De fato a aderência mediada pela fibronectina em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e amastigotas em monócitos humanos tem sido demonstrada por Wyler et al., (1985). Além disso, esses autores têm demonstrado que anticorpos policlonais anti-fibronectina poderiam inibir a adesão do parasito às células do hospedeiro e tem-se sugerido, então, o envolvimento do receptor de fibronectina em macrófagos (FnR) no reconhecimento nas células hospedeiras. Adicionalmente, Rizvi et al., (1988), descrevem em seu trabalho que a metaloproteína majoritária de *Leishmania* sp. denominada gp63 (glicoproteína 63) é uma molécula semelhante a FN que possui características biológicas e moleculares semelhantes à fibronectina. Além disso, tem-se observado a reação cruzada entre a gp63 e a fibronectina através do uso de anticorpos policlonais e monoclonais.

Em estudos com *Entamoeba histolytica* e *Schistosoma* spp. foi verificado que estes parasitos produzem proteases que degradam as fibronectinas e outras proteínas da matriz, facilitando assim, a penetração na barreira da mucosa intestinal (WYLER, 1987).

### 1.5.3 - Laminina (LN)

As lamininas compreendem uma família de proteínas com várias isoformas (1, 2, 4, 8,10), das quais as isoformas 2 e 4 são observadas no fígado. A expressão excessiva da laminina reflete processos inflamatórios e degenerativos em tecidos. Alguns trabalhos mostram que a laminina é secretada durante a regeneração hepática após hepatectomia radical ou na cirrose. A laminina assume um papel importante no processo de capilarização dos sinusóides (MARTINEZ-HERNADEZ et al., 1995). As células de Ito (células esteladas) no fígado e as células endoteliais são consideradas as fontes primárias de laminina (ODENTHAL et al., 1993).

A laminina é uma glicoproteína de alto peso molecular (900 kDa) encontrada em maior quantidade na membrana basal. A análise ultraestrutural revelou que a laminina possui a forma de cruz assimétrica, com três braços de tamanho idênticos e um braço longo (ENGEL et al., 1981). A conformação estrutural da laminina permite que ela atravesse a membrana basal e ligando-se de um lado com os receptores específicos da superfície celular (integrinas) e do outro lado aos componentes da matriz (COTRAN et al., 2000).

A laminina é a primeira proteína da matriz extracelular encontrada durante a embriogênese, sendo sintetizada precocemente já na fase de dois blastômeros. Ela desempenha várias atividades biológicas, tais como: aderência das células, crescimento e diferenciação de vários tipos celulares e múltiplas interações com a membrana basal (TIMPL & BROWN, 1994).

De acordo com Bandyopadhyay et al., (2002), a migração da leishmania através da MEC precede a adesão aos macrófagos e que a entrada na célula é mediada pela interação da laminina com os receptores laminina/parasita.

Os estudos das alterações da matriz intersticial na leishmaniose visceral são, sobretudo, aqueles relacionados ao colágeno quer seja no homem (BOGLIOLO, 1956; ANDRADE e ANDRADE, 1966; RAY et al., 1992), ou no cão (MELO et al., 2008). Alterações referentes à fibronectina (FN) e laminina nos diversos órgãos durante a infecção parecem inexistentes. Todavia, o trabalho recente de Kulkarni et al. (2008) "in vitro", descreve alterações da fibronectina na presença de promastigotas e amastigotas de três espécies de *Leishmania*: (1) *Leishmania amazonensis* (LV7B), (2) *Leishmania*

*major* (MHOM/SN/74/Seidman) e, (3) *Leishmania donovani* (MHOM/N/1983/AG83). Os autores demonstraram que as diferentes espécies de *Leishmania* não foram só capazes de degradar a FN, mas simultaneamente interferir negativamente na produção de radicais livres de oxigênio originados de macrófagos ativados, conferindo assim mais possível um mecanismo de escape desse parasito no hospedeiro vertebrado. Por outro lado, Pinheiro et al. (2006) demonstraram que macrófagos murinos infectados com cepas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/3456) e de *L. amazonensis* (Leila strain, MHOM/BR88/BA-125) são menos aderentes as proteínas da matriz intersticial como o colágeno, fibronectina (FN) e laminina (LN). Os autores sugerem que protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* são capazes de alterar a função das integrinas da família  $\beta$ -1 responsáveis pela interação dos leucócitos a matriz intersticial.

Assim, neste trabalho propomos um estudo das alterações da matriz intersticial em diversos órgãos de cães infectados com *Leishmania chagasi* buscando correlacionar essas alterações a achados clínicos e aos processos anátomo-patológicos e parasitológicos encontrados nos diversos órgãos de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*.

## 2 – OBJETIVOS

---

### 2.1 - Objetivos Gerais:

- Avaliar as alterações da matriz extracelular nos grupos de cães assintomáticos e sintomáticos em relação ao grupo controle, associado às análises das alterações histológicas.
- Correlacionar os aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina (LVC) com os processos imuno-histopatológicos encontrados no fígado, baço, linfonodos cervicais dos cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

### 2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar a deposição de fibras colágenas no fígado, baço e linfonodos cervicais dos animais dos três grupos estudados, correlacionando com a carga parasitária e aos aspectos clínicos.
- Avaliar as alterações histológicas no fígado, baço e linfonodos cervicais dos animais naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.
- Determinar a carga parasitária utilizando a técnica imuno-histoquímica para detecção de formas amastigotas de *Leishmania*, no fígado, baço e linfonodos cervicais.
- Quantificar as fibras adesivas: fibronectina (FN) e laminina (LN) nos diferentes grupos de estudo.
- Identificar a expressão da integrina CR3 (CD11b/CD18) nos diferentes órgãos correlacionando com parasitismo.

## **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.1 – Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal**

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, registrado no protocolo 190/06 em anexo.

### **3.2 - Animais**

Foram utilizados trinta cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte - MG, Brasil, sendo que vinte cães com exames sorológicos positivos para *Leishmania* através de testes de imunofluorescência indireta (RIFI) e imunoenensaio enzimático (ELISA - enzyme linked immunoabsorbent assay) e dez cães com sorologia e exame parasitológico negativo para *Leishmania*.

#### **3.2.1- Critérios de inclusão no estudo**

Foram incluídos, neste estudo, animais portadores ou não de sinais clínicos de leishmaniose visceral, leves ou moderados, com boa condição corporal, ausência de patologias concorrentes, com avaliações laboratoriais normais e diagnóstico parasitológico (mielograma ou mielocultura) positivo.

### **3.3 - Grupos Experimentais**

#### **Grupo 1 - Cães Sintomáticos**

Dez animais adultos, todos sem raça e idade definidas, com vários sinais clássicos da doença, tais como: anemia, caquexia, alterações cutâneas (alopecia, eczemas ou úlceras), onicogribose, ceratoconjuntivite, linfadenopatia, rigidez dos membros posteriores.

## **Grupo 2 - Assintomáticos**

Dez animais, sem raça e idade definidas sem sinais clínicos da doença.

## **Grupo 3 – Animais-Controle**

Dez cães adultos, sem idade e raça definidas, com exame sorológico e parasitológico negativos para *Leishmania*.

### **3.4 - Coleta e processamento histológico do material:**

#### **3.4.1 – Punção de medula óssea**

Os animais foram tranqüilizados com Acepromazina 1%, na dosagem de 0,1 mL/kg de peso por via intravenosa. Após 10 minutos, foi administrado anestésico geral, Tiopental Sódico 2,5%, na dose de 0,5 mL/kg de peso pela via intravenosa (MELO et al., 2008). Depois de atingido o plano anestésico adequado foi realizada a tricotomia e anti-sepsia (Iodopovidine Líquido a 1%) da região alvo. O aspirado medular foi obtido por punção da extremidade inferior do esterno ou da fossa intercondílica da tíbia. O conteúdo medular foi aspirado com agulha descartável, 12x40, acoplada à seringa descartável de 20 mL. Os esfregaços medulares, por sua vez, foram confeccionados em duplicata e corados por solução de Giemsa a 10%.

#### **3.4.2 – Eutanásia dos animais**

Os animais foram eutanaziados conforme Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais. O procedimento inclui tranqüilização dos animais com Acepromazina 1%, na dosagem de 0,1 mL/kg de peso por via intravenosa e após 10 minutos, aplicação de anestésico geral, Thiopental Sódico 2,5%, na dose de 0,5 mL/kg de peso por via intravenosa. Depois de atingido o plano anestésico adequado foi administrado uma dose letal (0,3 mL/Kg) de T-61<sup>®</sup>. (MELO et al., 2008). Após a comprovação da morte

do animal foram iniciados os procedimentos para a necropsia e retirados os órgãos a serem analisados.

### **3.4.3 – Coleta de fragmentos dos órgãos**

Os órgãos foram analisados macroscopicamente levando-se em consideração critérios como tamanho, peso e presença de lesões. Em seguida, foram retirados fragmentos de fígado, baço, linfonodo cervical, pele de orelha e costela. Foram realizados esfregaços por aposição e os fragmentos foram preservados em formol tamponado a 10% - pH 7,2 para inclusão em parafina e uma outra parte criopreservada a -70°C em Tissue Tek®.

### **3.4.4 – Avaliação histopatológica dos órgãos**

As lâminas contendo cortes parafinados de fígado, baço, linfonodo cervical foram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina (descrita no item 3.4.5) e analisadas por microscopia óptica. As alterações avaliadas no baço foram o espessamento e inflamação da cápsula, hipertrofia e hiperplasia da polpa branca e da polpa vermelha, congestão, deposição de hemossiderina e depleção de áreas T dependentes na polpa branca. No fígado observou-se a presença de granulomas, inflamação portal, fenômenos degenerativos, inflamação da cápsula, congestão sinusoidal, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer e deposição de hemossiderina. No linfonodo avaliou-se a linfadenite capsular, inflamação dos seios subcapsulares, hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides e dos macrófagos, congestão e presença de hemossiderina.

As alterações histopatológicas foram avaliadas de forma semi-quantitativa, levando-se em consideração a extensão das alterações em todo o corte histológico, sendo assim classificadas: (1) Ausência de alteração; (2) Alteração discreta; (3) Alteração moderada; (4) Alteração intensa.



### **3.4.5 - Técnica da Hematoxilina-Eosina (HE)**

As lâminas foram inicialmente desparafinadas em xilol, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes, e a seguir, lavadas com água corrente. Logo após, foram coradas em hematoxilina e, após nova lavagem, novamente coradas em eosina. As lâminas foram, então, imersas em água corrente, desidratadas em soluções de álcool crescente e posteriormente diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo sintético.

### **3.4.6 – Avaliação da densidade de parasitos nos órgãos**

A presença de parasitos nos órgãos foi avaliada pelo método de imunohistoquímica, utilizando-se a técnica da estreptoavidina-peroxidase (descrita no item 3.4.7). A análise foi quantitativa levando-se em conta o número de amastigotas encontrado em vinte campos observados (440x) ao microscópio óptico.

### **3.4.7 - Técnica da estreptoavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas de *Leishmania*.**

A Imuno-histoquímica para marcação de formas amastigotas de *Leishmania* em material embebido em parafina (Tafari *et al.*, 2004), nos vários órgãos estudados, visando correlacionar as lesões com a presença do parasito nos órgãos. Na seqüência, as lâminas, contendo cortes parafinados de tecidos, foram desparafinadas em xilol por 20 minutos, hidratadas em soluções de álcoois decrescentes (álcool absoluto, 90°, 80° e 70° respectivamente) e submetidas a um banho em PBS (“Phosphate Buffer Saline”-pH 7,2, 0,01M) a 10%. Posteriormente fez-se o bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes diluída a 4% em PBS), por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram, então, cobertas com solução de bloqueio (Leite em pó desnatado diluído em PBS -12g de leite em 200 mL de PBS) e incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, o anticorpo primário (soro de cão infectado

com *L. chagasi*, na diluição de 1/100 em BSA – soro albumina bovina) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 24 horas em câmara úmida a 4°C. A seguir, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1/100 - DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675, segundo Tafuri et al, 2004) e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se, então, o complexo estreptoavidina peroxidase seguido de incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16% em PBS, por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente fez-se a lavagem das lâminas em água corrente e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas em álcoois crescentes (70°, 80° 90° e álcool absoluto), diafanizadas em xilol, e montadas com bálsamo sintético.

Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. Como controle negativo, utilizou-se PBS, em substituição aos anticorpos primários. Como controle positivo foi utilizado uma lâmina com corte histológico de pele de orelha de um cão naturalmente infectado com *Leishmania*.

#### **3.4.8 – Caracterização Imuno-histoquímica da laminina (LN) e do infiltrado inflamatório nos órgãos pela técnica da estreptoavidina-peroxidase**

Para caracterização Imuno-histoquímica da laminina (LN) nos órgãos utilizou-se o anticorpo de coelho anti-laminina (AHP420T Serotec®), e para caracterização das células inflamatórias teciduais Mouse anti canine Anti CD11b e Mouse anti canine Anti CD18 em seções histológicas de 4µm criopreservadas (Quadro 1).

Os fragmentos dos órgãos fixados na solução criopreservadora Tissue Tek® foram cortados em criostato a 4,0 µm de espessura e fixados em lâminas previamente desengorduradas com solução álcool-éter. Posteriormente, os

cortes de tecido foram hidratados em álcoois decrescentes (álcool absoluto, 90°, 80° e 70° respectivamente) e submetidas a um banho em PBS ("Phosphate Buffer Saline"- pH 7,2, 0,01M) a 10%. Posteriormente fez-se o bloqueio da peroxidase endógena adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes diluída a 4% em PBS), por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram, então, cobertas com solução de bloqueio (Leite em pó desnatado diluído em PBS -12g de leite em 200 mL de PBS) e incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, o anticorpo primário específico (descritos no quadro 1) foi adicionado em quantidade suficiente para recobrir os fragmentos, sendo as lâminas incubadas por 18 a 24 horas em câmara úmida a 4°C. A seguir, adicionou-se o anticorpo secundário biotinilado (anticorpo biotinilado de cabra anti camundongo e anti coelho, na diluição de 1/100 - DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675, segundo Tafuri et al, 2004) e as lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se, então, o complexo estreptoavidina peroxidase seguido de incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando-se solução de Diaminobenzidina (DAB) a 0,024% em PBS acrescida de solução de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16% em PBS, por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente fez-se a lavagem das lâminas em água corrente e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas em álcoois crescentes (70°, 80° 90° e álcool absoluto), diafanizadas em xilol, e montadas com bálsamo sintético. Como controle negativo, utilizou-se PBS, em substituição aos anticorpos primários.

#### **3.4.9 – Caracterização imuno-histoquímica da Fibronectina (FN)**

Para a caracterização Imuno-histoquímica da fibronectina (LN) nos órgãos, em seções histológicas de 4µm, criopreservadas a -70°C utilizou-se o anticorpo de coelho anti-fibronectina humana, conforme descrito no quadro 1.

Após a biopsia os fragmentos dos tecidos foram incluídos em meio especial para tecido congelado (**OCT** Tissue Teck- meio para congelamento de material de biopsia, Milles Inc., USA) e armazenados em freezer a -70°C onde

permaneceram até o processamento. Os cortes histológicos para essa técnica foram feitos em criostato à temperatura de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a  $4\mu\text{m}$  de espessura, fixados em etanol gelado por 15 minutos. Após os tecidos atingirem a temperatura ambiente, a área dos cortes foi demarcada. Em seguida os cortes foram bloqueados com PGN puro (PBS + 0,25% de gelatina em pó + 0,1% de azida em pó) durante 15 minutos. Sendo em seguida depositados  $30\mu\text{L}$  do segundo anticorpo primário diluído em PGN+saponina, para fibronectina foi utilizado o anticorpo monoclonal coelho anti-fibronectina 1:400 (F 3648 - Sigma), encubou-se em câmara úmida por 40 minutos e logo após lavou-se com PBS 3 vezes por cinco minutos cada lavagem. Enxugaram-se os cortes e colocou-se o anticorpo secundário (cabra anti-camundongo conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína). Encubou-se por 40 minutos em câmara úmida ao abrigo da luz. Lavou-se em PBS. As lâminas foram montadas com glicerina e seladas com esmalte. Observadas ao microscópio de imunofluorescência.

<b>QUADRO 1</b>		
<b>Anticorpos utilizados</b>		
<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>
Mouse anti canine Anti CD11b	1/100	MCA 1777S - Serotec
Mouse anti canine Anti CD18	1/100	MCA 1780S - Serotec
Rabbit anti Laminina	1/400	AHP 420T - Serotec
Rabbit anti Fibronectina	1/400	F3648 - Sigma

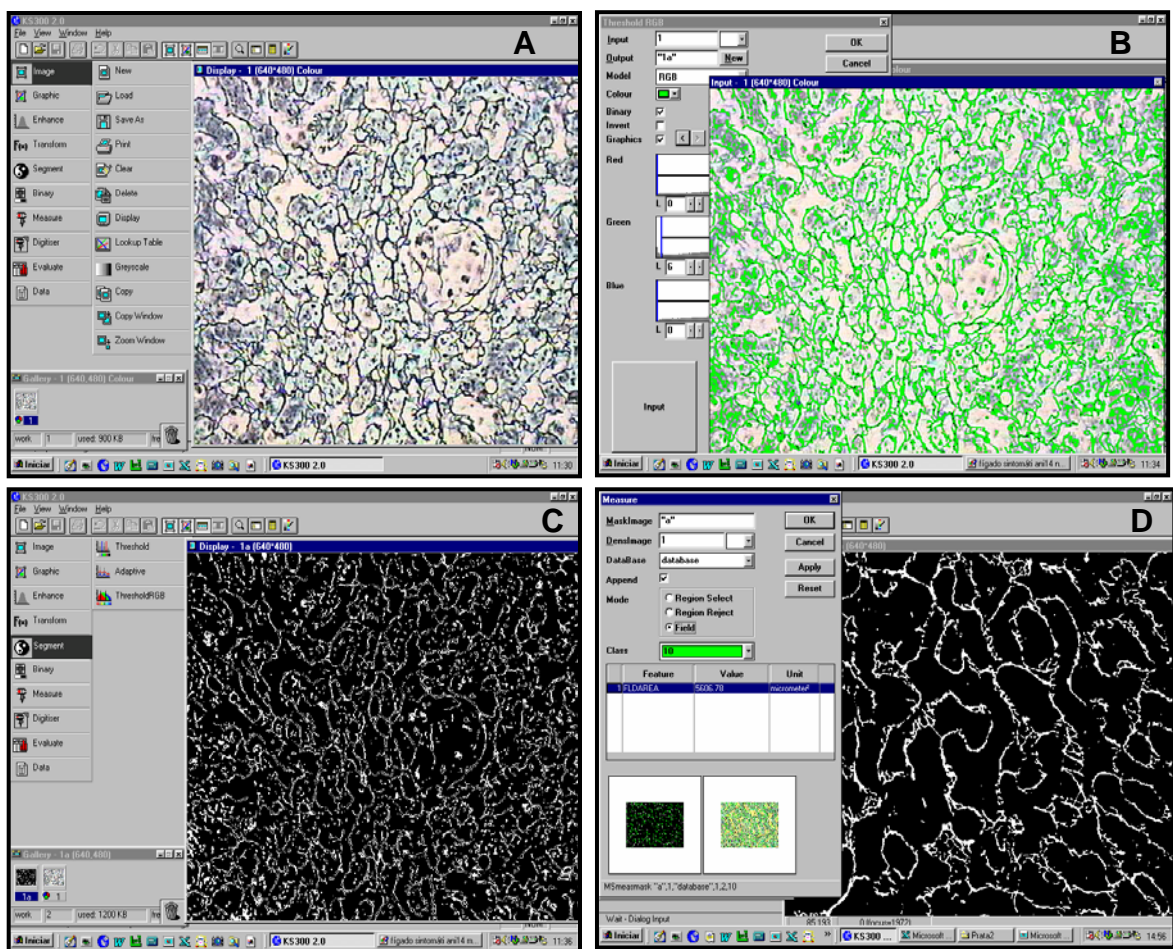
### 3.5 - Estudo do colágeno

Utilizou-se para marcação das fibras colágenas a técnica histoquímica Prata Amoniacal de Gomori na quais as fibras são destacadas em preto. As lâminas foram desparafinizadas em xilol por cerca de 20 minutos, em seguidas hidratadas em ordem decrescente de álcoois (absoluto ao álcool 70%) até o banho de 5 minutos em água corrente. Cada lâmina foi coberta com a solução aquosa de permanganato de potássio 0,5% durante 2 minutos, em seguida lavou-se rapidamente as lâminas até atingirem a cor marrom claro. O passo seguinte foi pingar solução aquosa de ácido oxálico 3% até os cortes ficarem embranquecidos e em seguida foram lavadas em água corrente rapidamente. Encubar as lâminas com sulfato férrico amoniacal 2% por 2 minutos e lavar com água destilada e em seguida corou-se as lâminas com a Prata amoniacal de Gomori por cerca de dois minutos, lavando-se em seguida e cobrindo os cortes com solução aquosa de formol a 20%, até observar o enegrecimento das seções histológicas. Lavar rapidamente e mergulhar as lâminas na solução aquosa de cloreto de ouro 0,2% por três minutos e lavar em seguida com água destilada. Cobrir os cortes com hipossulfito de sódio 2% por um minuto e lavar rapidamente com água destilada. Para a contra coloração cobriu-se os cortes com Verde Luz 1 % por 30 segundos e lavaram-se as lâminas com água destilada. Seguiu-se, então com a desidratação das lâminas em álcool 70% até os absoluto I e II e diafanização rapidamente em xilol por no máximo 10 minutos. Lâminas motadas em Entellan®.

Os cortes histológicos do fígado, baço e linfonodos corados pela coloração pela Prata Amoniacal de Gomori foram analisados para quantificar as fibrilas colágenas e reticulares quantificadas. Assim, esse programa de computador, permitiu que as estruturas fossem marcadas e quantificadas através de sua coloração diferencial com outras estruturas. Cada estrutura corada de interesse foi selecionada manualmente, e o computador criou uma imagem negativa da mesma (binarização da imagem), e na seqüência as medidas foram realizadas de modo automático (Figura 1) e os resultados expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

### **3.6 - Análise morfométrica das fibras colágenas, laminina, fibronectina e da expressão das CR3 positivas.**

Após cada marcação, foram capturadas 20 imagens aleatórias do corte histológico de cada animal, utilizando-se uma micro-câmera JVC TK-1270/RGB e, em seguida, digitalizadas na objetiva de 40X para a criação de um banco de imagens. Todos os campos marcados foram contados com o auxílio do software KS300 contido no analisador de imagens Kontron Elektronik / Carl Zeiss. Os métodos morfométricos utilizados estão descritos no livro “Princípios de morfometria digital KS300 para iniciantes” (CALIARI, 1997).



**Figura 1** – Imagens para os comandos mostradas pelo software KS300 para determinação da deposição de colágeno no parênquima hepático. (A) Digitalização da imagem; (B) Seleção dos pixels das fibras colágenas; (C) Obtenção da imagem binária para posterior obtenção da área correspondente ao colágeno; (D) imagem de área correspondente ao colágeno.

### **3.7 - Análise estatística**

Todas as análises estatísticas inferências ou descritivas foram realizadas utilizando-se dos softwares INSTAT3 *for Windows* e PRISM versão 3.0.

Baseando-se na natureza da distribuição não paramétrica dos dados obtidos para o parasitismo dos animais, para análises de inferência entre dois dos grupos estudados foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para análises de correlação o teste aplicado foi o Coeficiente de Correlação de Spearman.

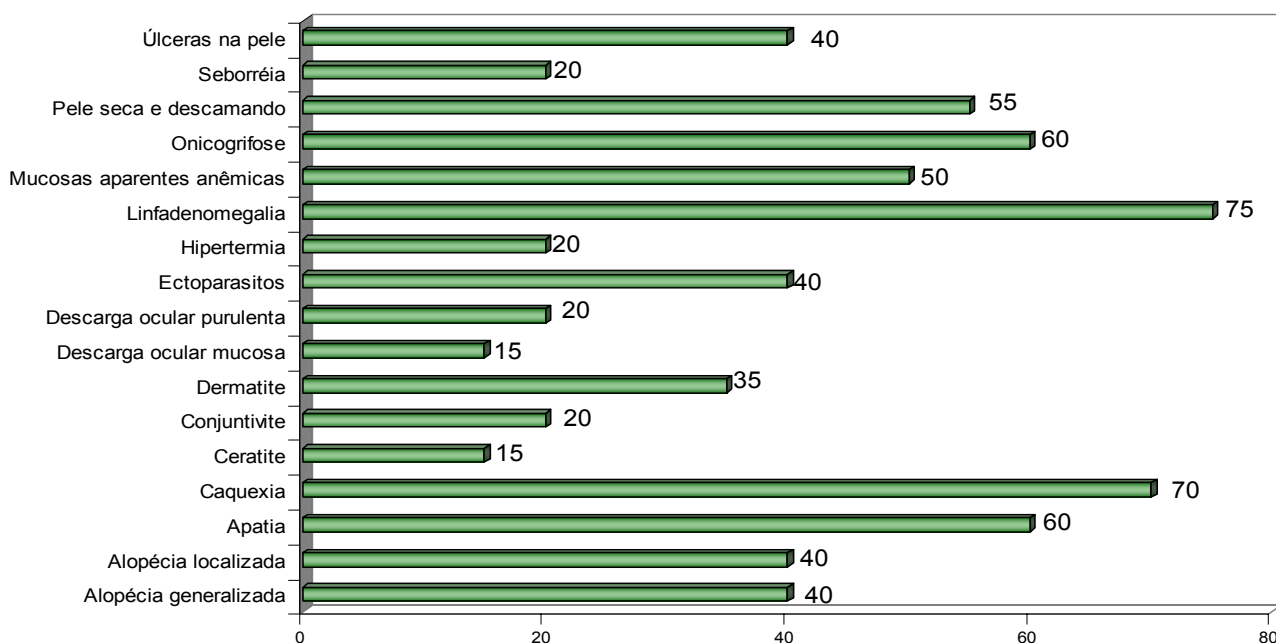
Dados obtidos para a expressão da laminina, fibronectina e das fibras reticulares apresentaram distribuição normal, sendo as inferências desses dados quando para dois grupos realizados pelo teste-T, para mais de dois grupos realizados no teste de variância da Tabela ANOVA e as análises de correlação pelo Coeficiente de Correlação de Pearson e pela matriz de correlação de Pearson com índice de significância menor que 5%.



## 4 – RESULTADOS

### 4.1 - Avaliação clínica dos animais

Os principais sinais clínicos apresentados pelos cães utilizados nesse trabalho estão demonstradas no gráfico 1. As lesões mais frequentemente encontradas foram a linfadenomegalia, caquexia e as alterações cutâneas, tais como: descamação, dermatite seborréica, alopecia, úlceras e onicogribose.



**Gráfico 1** - Valores percentuais do número de animais naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* (assintomáticos e sintomáticos) que apresentaram sinais clínicos durante a avaliação.

## 4.2 - Fígado

### 4.2.1 - Macroscopia

As principais alterações macroscópicas observadas no fígado foram o aumento de peso e volume do órgão (hepatomegalia), coloração vermelho-escuro, bordas espessadas sugerindo congestão. Ao corte o órgão deixava fluir considerável quantidade de sangue caracterizando o quadro de congestão.

Houve em alguns casos a presença de nódulos de coloração brancacenta, tamanhos variando de 0,2 a 0,5 cm, distribuídos aleatoriamente na superfície do órgão, sem predileção por um lóbulo hepático ou outro. Todavia, estes não se aprofundavam à superfície de corte. Essas lesões sugeriam a presença de granulomas.

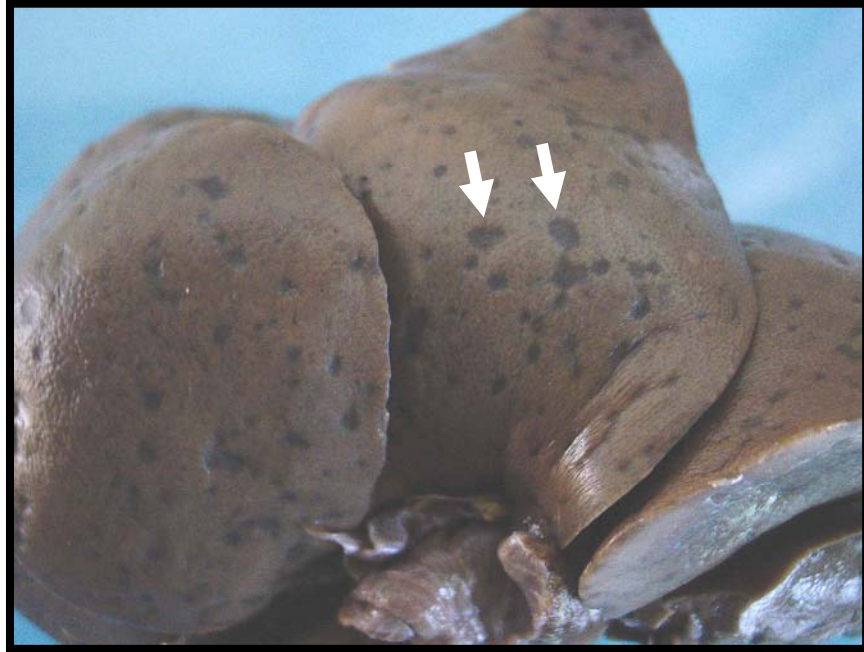
Em um caso o fígado apresentou um aspecto peculiar. A superfície era irregular caracterizada por lesões de coloração clara ou brancacenta, de formas e tamanhos variados irregulares promovendo depressões, e distribuídas difusamente, mas que não se aprofundavam ao corte (Figura 2).

Os dados obtidos em relação aos pesos relativos dos fígados estão demonstrados na Tabela 1. Houve diferença estatística em relação ao peso relativo (%) do fígado entre os grupos analisados (ANOVA  $p < 0,0001$ ).

**Tabela 1-** Peso relativo (peso do fígado/peso corporal) dos fígados dos animais dos grupos assintomáticos, sintomáticos naturalmente infectados com *L. chagasi* e grupo controle.

<b>Grupos</b>	<b>Peso relativo (%) (média ± SR)</b>
<b>Controle</b>	2,460 ± 0,6518 <sup>a</sup>
<b>Assintomático</b>	3,380 ± 0,5770 <sup>b</sup>
<b>Sintomático</b>	4,160 ± 0,6518 <sup>c</sup>

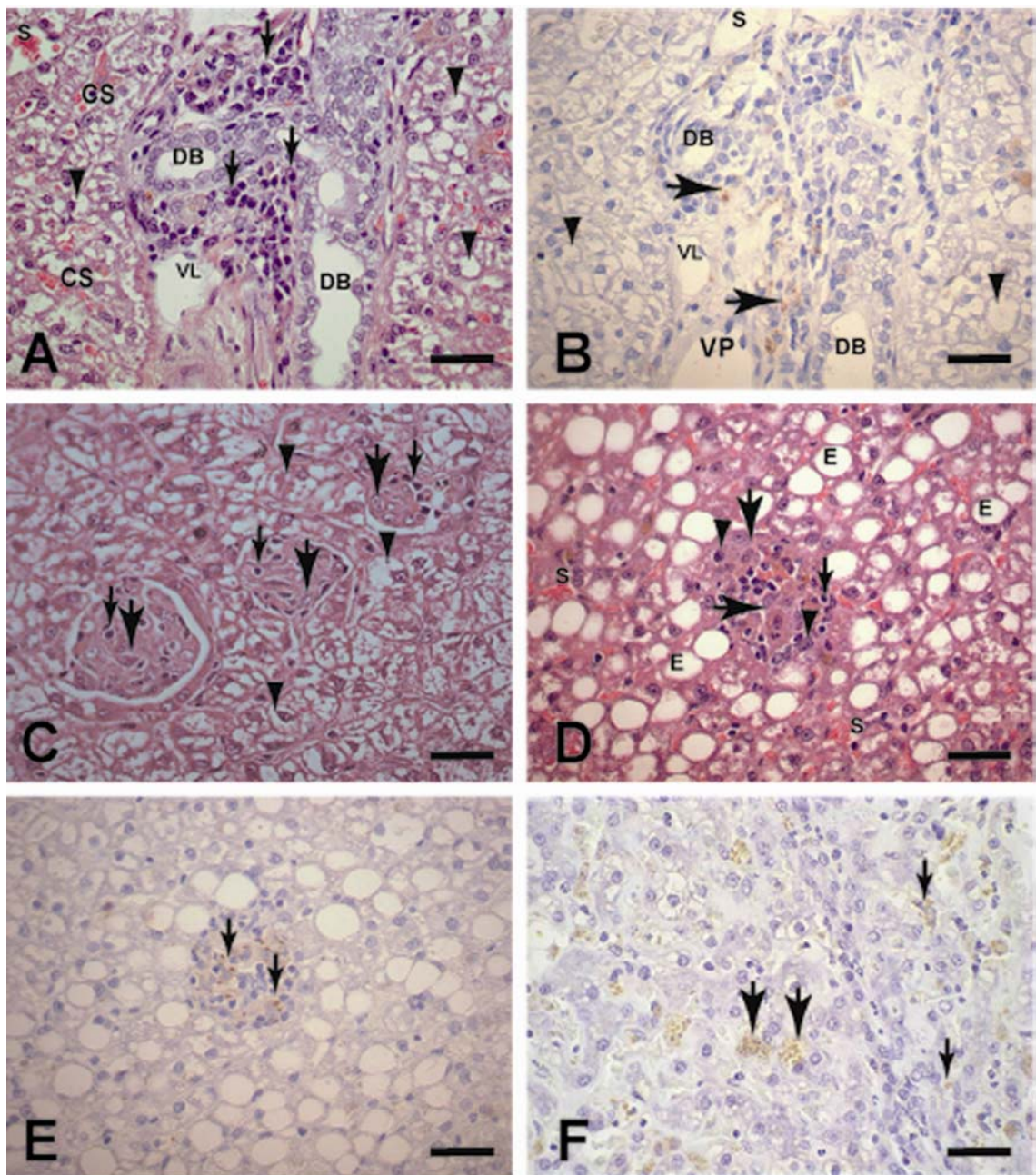
Os resultados expressos como médias dos valores ± erro padrão. As diferenças estatisticamente significativas referem-se às letras a,b e c. ANOVA  $p < 0,0001$ .



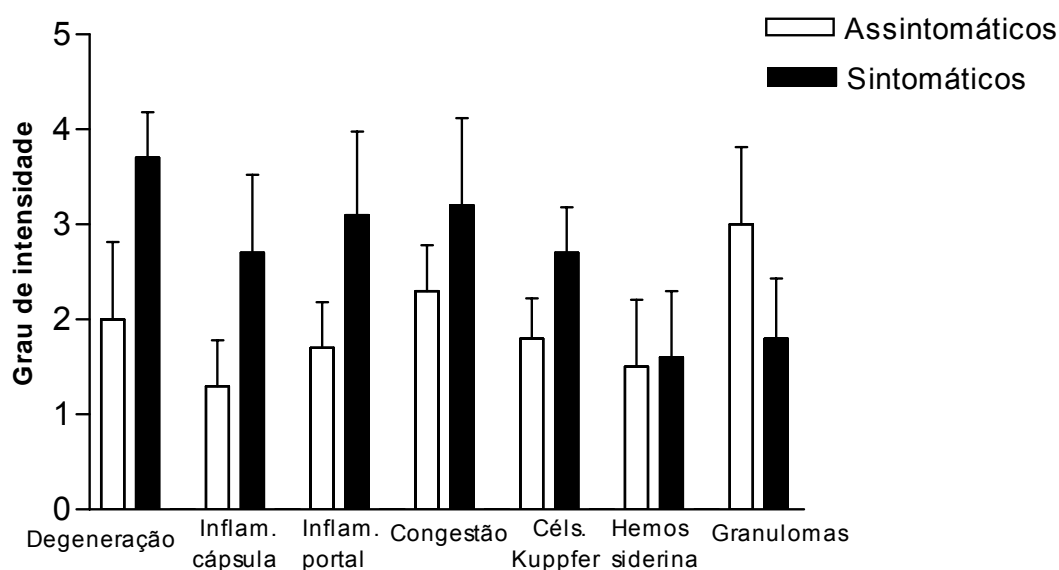
**Figura 2:** Fígado de cão sintomático naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (órgão fixado em formol 10%) Observar superfície irregular caracterizada por lesões de coloração escura após fixação, mas que anteriormente eram brancacentas a fresco (setas brancas). Essas lesões são distribuídas difusamente em todos os lobos, de tamanhos e formas variados, e por vezes promovendo áreas de depressões na superfície.

#### 4.2.2 - Microscopia

Ao exame microscópico, os fragmentos de fígado de todos os animais naturalmente infectados, independentemente do grupo clínico estudado, apresentaram-se com lesões qualitativamente muito semelhantes, variando apenas em intensidade. Assim, os principais achados histopatológicos foram: (1) inflamação portal e da cápsula variando de discreta a intensa, com predomínio de células mononucleares (plasmócitos, macrófagos e linfócitos) e raros polimorfonucleares de permeio. Os macrófagos estavam parasitados ou não com formas amastigotas de *Leishmania* (Figura 3A,B); (2) presença de granulomas de localização preferencialmente intralobular e mais raramente nos espaços-porta hepáticos. Os granulomas eram constituídos principalmente de macrófagos, parasitados ou não, plasmócitos, linfócitos e raros polimorfonucleares neutrófilos e/ou eosinófilos. (Figura 3C,D,E); (3) hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer (Figura 3F), muitas das quais parasitadas por amastigotas; (4) degeneração hidrópica e esteatose microvesicular (Figuras 3A,C,D); (5) congestão sinusoidal e hemossiderose difusa, mas pouco significativas. As análises das lesões foram semi-quantitativas como mostra o Gráfico 2 (página 37).



**Figura 3A-F:** Cortes histológicos parafinados de fígado de cães naturalmente infectados com *L. (L) chagasi*. A e B – Cão assintomático. (A)- Espaço portal com infiltrado celular de plasmócitos (setas), linfócitos e macrófagos. Notar hepatócitos em degeneração hidrópica (cabeça de seta). Congestão sinusoidal pode ser observada (CS), e em (B) Observar formas amastigotas de *Leishmania* nos macrófagos (seta larga) e hepatócitos vacuolizados (células baloniformes) (cabeças de seta). (C) Cão sintomático. Granuloma intralobular contendo macrófagos (células epitelióides) (setas largas), plasmócitos e linfócitos (seta pequena). Hepatócitos com degeneração hidrópica (cabeça de seta). (D,E)- Cão assintomático. (D) Presença de granuloma intralobular contendo células epitelióides com núcleos alongados ou ovais (seta larga), linfócitos (seta pequena) e plasmócitos (cabeça de seta), e em (E) mesmo campo mostrando amastigotas no interior dos macrófagos dos granulomas (setas). (F)- Cão sintomático: Notar no campo, células de Kupffer intensamente parasitadas (setas largas). DB-ducto biliar; LV-vaso linfático; VP- veia porta; S- sinusóide; ES-esteatose; C: congestão. A,C,D-H&E; B,E,F- Estreptoavidina-peroxidase. Todas as barras =16µm.



**Gráfico 2** - Alterações histopatológicas observadas no fígado de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, grupos assintomáticos e sintomáticos.

#### 4.2.3 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos hepáticos

Um cão do grupo assintomático apresentou aumento da aminotransferase de aspartato (AST) e seis animais do grupo de sintomáticos apresentaram valores acima do normal para cães (80mg/dL). Nenhum cão do grupo de assintomáticos apresentou aumento dos níveis de aminotransferase de alanina (ALT), porém sete cães do grupo de sintomáticos apresentaram elevação para esse parâmetro.

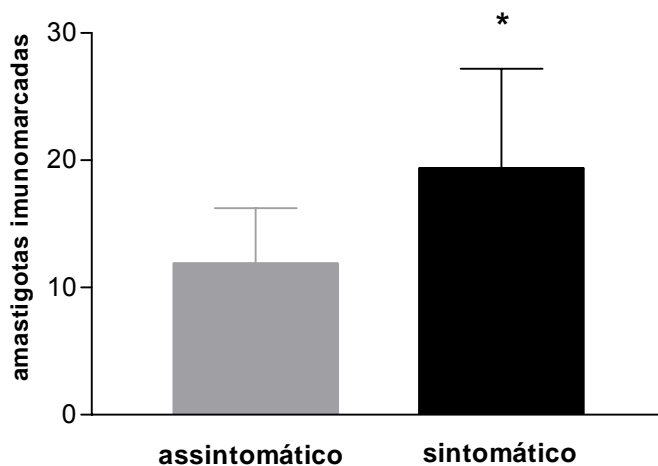
A tabela apresenta os resultados da avaliação bioquímica hepática em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e não infectados. A análise dos dados revelou que houve diferença significativa na dosagem da ALT entre os grupos de animais controles e sintomáticos ( $p < 0,01$ , teste T de Tukey) e entre animais dos grupos assintomáticos e sintomáticos ( $p < 0,05$ , teste T de Tukey) para o mesma enzima. Não houve diferença significativa para o parâmetro AST entre os grupos estudados (Tabela 2).

**Tabela 2** - Avaliação dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* e animais não infectados

Grupos	Parâmetro Bioquímico (mg/dL)	
	AST / TGO	ALT / TGP
<b>Controle</b>	61,70 ± 8,46	29,70 ± 7,32 <sup>c</sup>
<b>Assintomático</b>	68,60 ± 21,23	41,90 ± 11,31 <sup>a</sup>
<b>Sintomático</b>	95,30 ± 38,97	130,00 ± 110,59 <sup>b</sup>

Os resultados expressos como média dos valores ± desvio padrão. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) referem-se as letras a, b e c.

O do parasitismo hepático foi então caracterizado pela técnica da imunohistoquímica, e posteriormente quantificado o número de amastigotas imuno-marcadas pela técnica em vinte campos analisados na objetiva de 40X. Houve diferença estatística significativa de acordo com o Teste T não pareado ( $p < 0,05$ ) entre os dados do parasitismo nos grupos clínicos estudados, sendo que nos animais sintomáticos o parasitismo foi mais elevado (Gráfico 3).



\*  $p = 0,0158$

**Gráfico 3** – Número de amastigotas marcadas por imuno-histoquímica no fígado dos cães dos grupos assintomáticos e sintomáticos (\*  $p < 0,05$  Teste T não pareado).



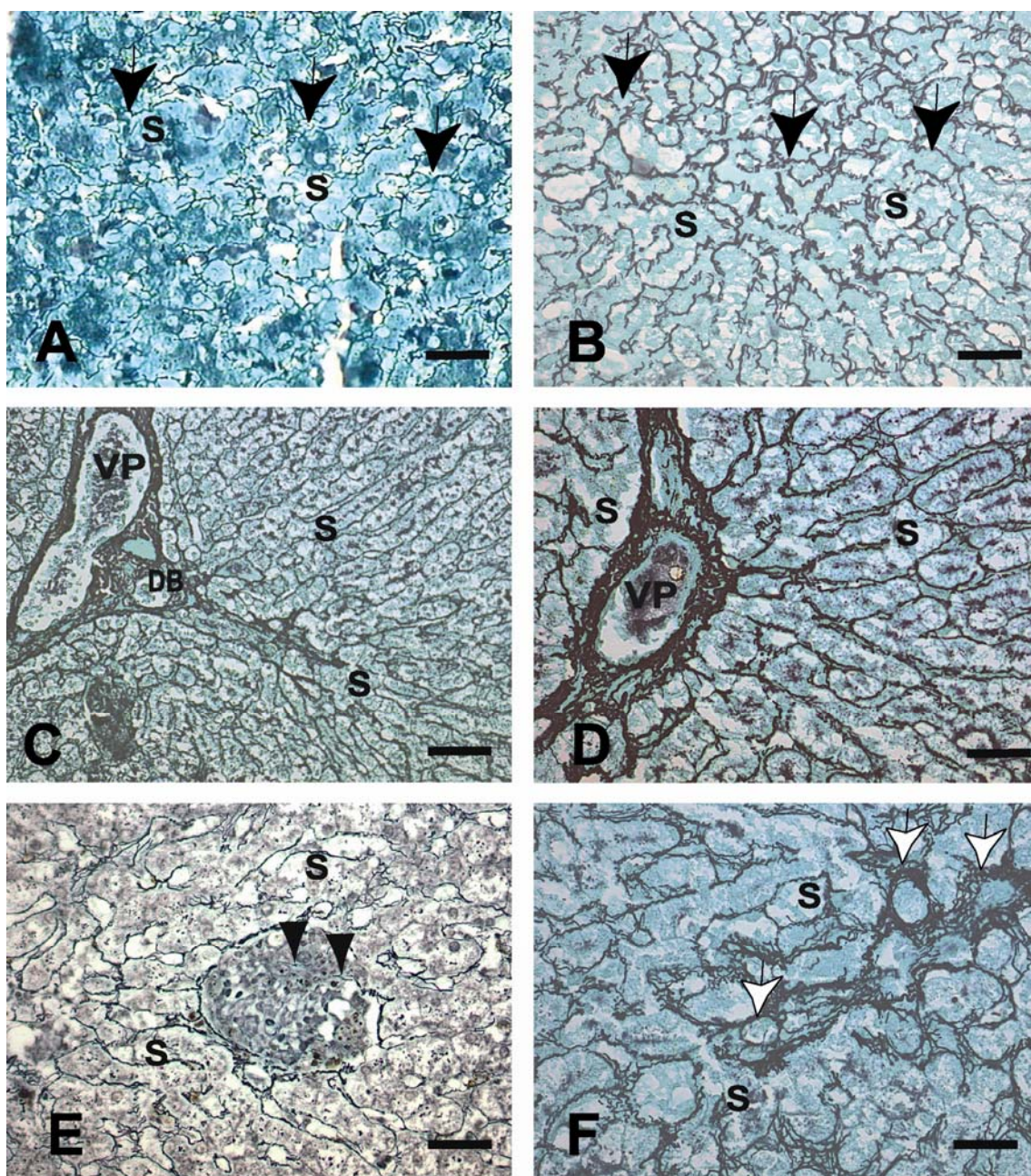
#### **4.2.4 - Avaliação das fibras colágenas (reticulares) hepáticas pela prata amoniaca de Gomori**

As fibras reticulares hepáticas dos cães sintomáticos encontravam-se nitidamente mais espessadas em relação ao grupo controle. Essas foram facilmente observadas na região do espaço porto-biliar e na parede dos sinusóides dos lóbulos hepáticos. Essas fibras eram dispostas difusamente em várias direções formando uma trama mais espessa (Figura 4A,B) e por vezes dando a impressão de estarem partindo dos espaço-porta para o centro do lóbulo (Figuras 4C,D). Conforme comentado, anteriormente, a presença de granulomas intralobulares foi um achado freqüente, mas raras fibras reticulares puderam ser observadas dentro dessas estruturas como mostrado na Figura 4E.

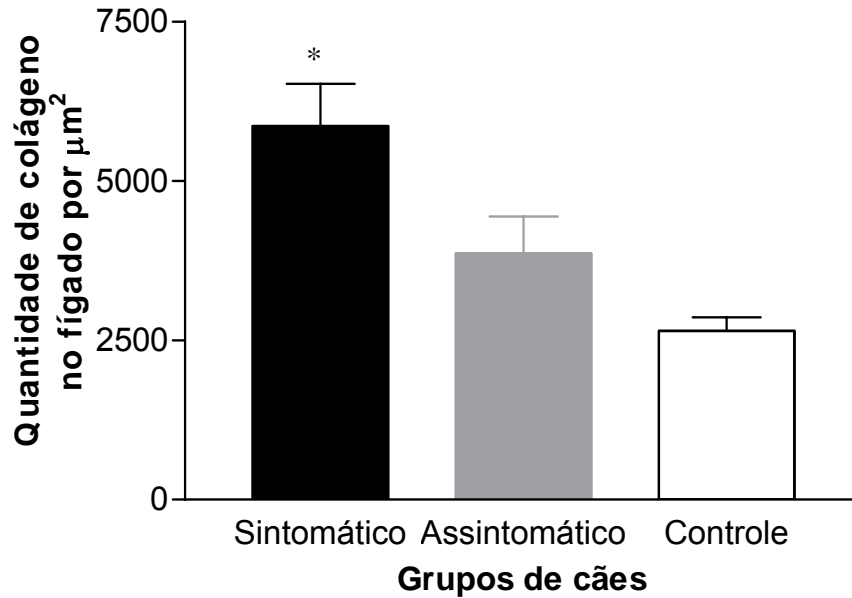
Em dois animais foi observada uma fibrose difusa peculiar. Essas fibras circundavam grupos de hepatócitos ou mesmo uma só célula, adquirindo o aspecto da cirrose monocelular de Natan-Larrier, (1918) e, de modo difuso, principalmente em determinadas áreas, semelhante a chamada “Cirrose de Rogers”, descrita por Rogers em 1908 no calazar indiano (Figura 4F).

Os resultados da quantificação do colágeno hepático mostraram aumento significativo da deposição do colágeno hepático em ambos os grupos de animais infectados (sintomáticos e assintomáticos), em relação aos animais controle (ANOVA  $p < 0,0001$ ). Entretanto, animais sintomáticos mostraram uma fibrilopiose mais intensa quando comparamos aos grupos de animais assintomáticos e controle (Gráfico 4 – pág. 42).





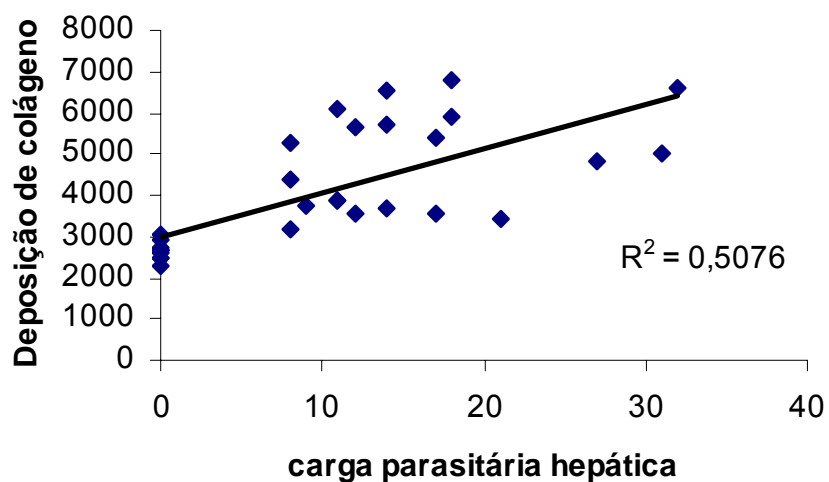
**Figura 4A-F:** Cortes histológicos parafinados de fígado de cães controle e cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Cão controle. Observar delicada trama de fibras colágenas (reticulares) intralobulares delineando os sinusóides (setas). (B) Cão sintomático. Observar fibras colágenas intralobulares com espessamento marcante (setas). (C,D) Cão assintomático. (C) Notar fibras reticulares espessadas partindo do espaço porta em direção ao lóbulo evidenciando os sinusóides. (D) Detalhe da figura anterior mostrando fibras reticulares espessadas ressaltando os sinusóides. (E) Cão assintomático: Granuloma intralobular (seta) mostrando raras fibras colágenas no seu interior (cabeças de seta). (F) Cão sintomático: Observar um notável espessamento das fibras colágenas e por vezes com enclausuramento de uma única célula (hepatócito) (setas brancas). (VP) Veia Porta; (DB) Ducto Biliar; (S) Sinusóides. Prata Amoniacal de Gomori. Barras (A,B,D,E e F) = 16µm e em (C) = 32µm.



**Gráfico 4** - Deposição de colágeno no fígado de cães nos diferentes grupos estudados. Prata Amoníacal de Gomori , (ANOVA \*  $p < 0,0001$ ).

#### 4.2.5 - Correlação entre o parasitismo hepático e a deposição de colágeno

As análises de correlação entre a deposição de colágeno hepático e a carga parasitária no fígado mostraram correlação positiva. Considerada extremamente significativa ao teste de correlação de Pearson ( $r = 0,7124$ ,  $p < 0,0001$ ) como mostra o Gráfico 5.



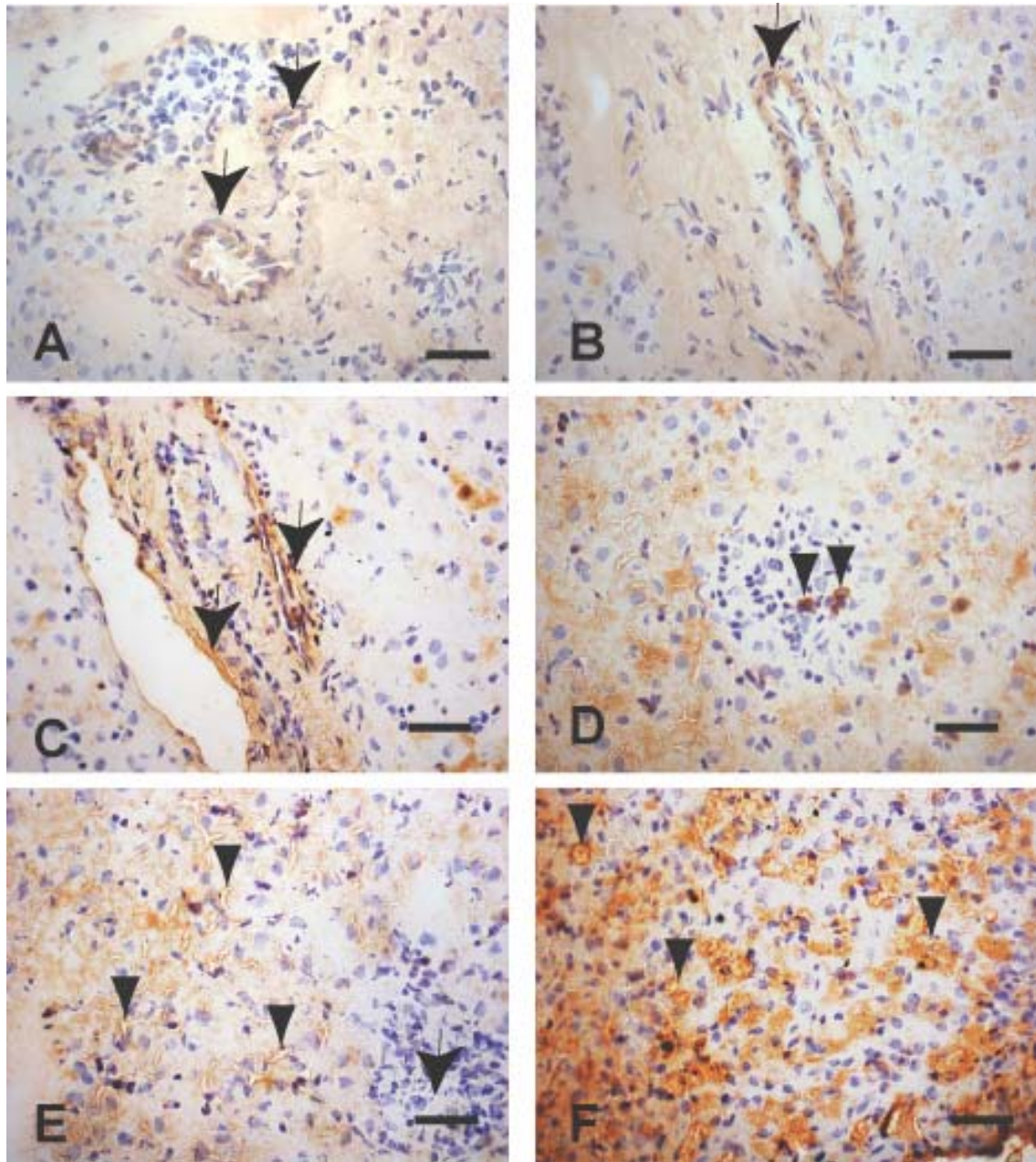
**Gráfico 5** - Correlação entre o parasitismo hepático e a deposição de colágeno no fígado de cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. Pearson ( $r = 0,7124$ ,  $p < 0,0001$ ).

#### **4.2.6 - Avaliação da laminina (LN) hepática**

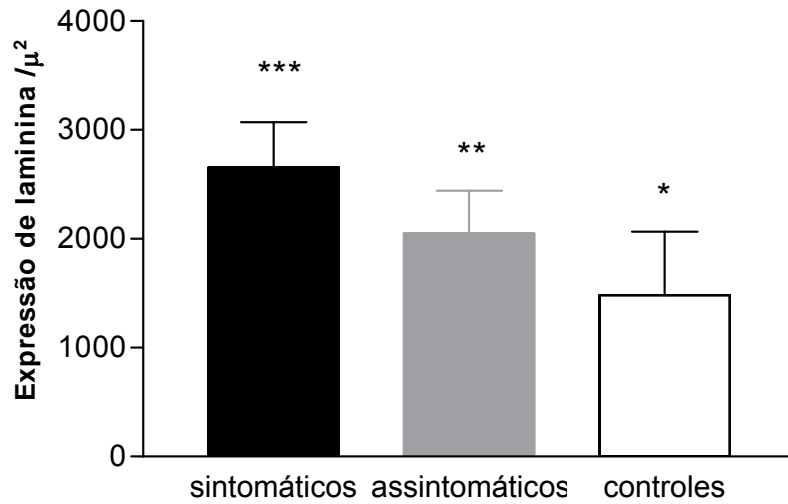
A laminina hepática encontrada no fígado principalmente nas regiões portais e na parede das veias centrais (Figura 5A, B). Na parede dos sinusóides foi descontínua (Figura 5E,F), e mais acentuada nos grupos de animais sintomáticos e assintomáticos.

Na quantificação da LN hepática observou-se aumento significativo da deposição do colágeno hepático nos animais do grupo sintomáticos e assintomáticos em relação aos animais do grupo controle (ANOVA  $p < 0,0001$ ). Nos animais do grupo sintomático esse aumento foi mais acentuado e estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ , teste T tukey) quando comparamos aos grupos de animais assintomáticos e controle. (Gráfico 6 – pág. 44).





**Figura 5A-F** – Cortes congelados de fígado de cães controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. (A,B) Cão Controle: Expressão da laminina em células de estruturas da região portal (setas). (C,D): Cão Assintomático: (C) Presença de laminina nas estruturas vasculares e em (D) granuloma com poucas células positivas para laminina (setas). (E,F): Cão Sintomático: Presença de marcação nos sinusóides (setas) de forma difusa. No canto direito inferior observar um granuloma sem marcação com amastigotas (seta), e em (F) Notar forte marcação da laminina nos sinusóides. Estrepto-avidina-peroxidase. Todas as Barras = 50  $\mu$ m.

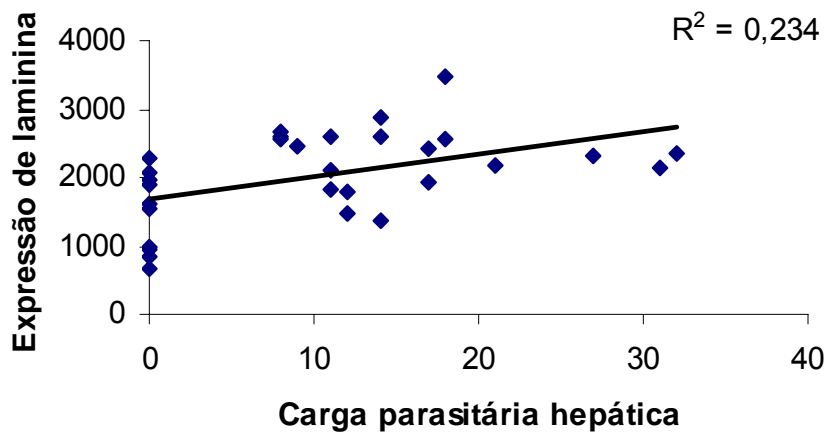


\*\*\* $p < 0,001$ , \*\*, \*  $p < 0,05$  teste T de Tukey

**Gráfico 6** – Análise morfométrica da expressão de laminina hepática pela técnica imunohistoquímica cães nos diferentes grupos estudados.

#### 4.2.7 - Correlação entre a expressão da laminina e o parasitismo hepático.

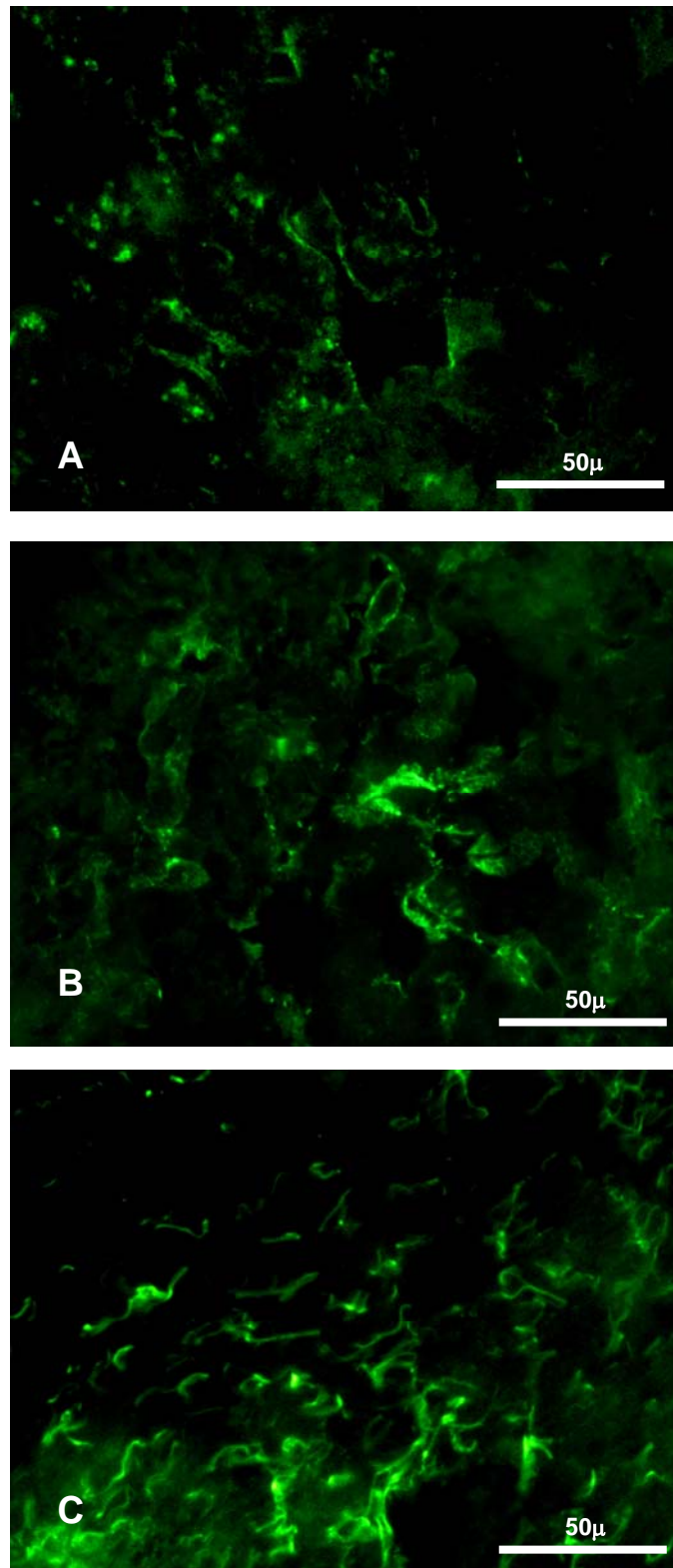
A Correlação entre a expressão da laminina e a carga parasitária no fígado foi considerada positiva (Gráfico 7), estatisticamente significativa pelo teste de correlação de Pearson ( $r=0,4838$ ,  $p=0,0068$ ).



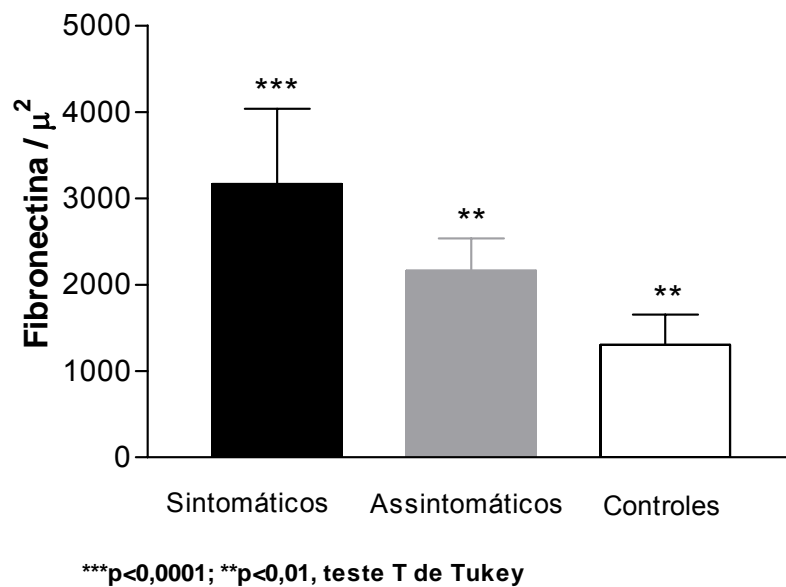
**Gráfico 7** – Correlação entre a carga parasitária hepática e a expressão da laminina no parênquima hepático. Pearson,  $r=0,4838$ ,  $p=0,0068$ .

#### **4.2.8 - Avaliação da Fibronectina (FN) Hepática**

A Fibronectina no fígado nos grupos estudados, assim com a laminina, encontrava-se distribuída, principalmente, nas regiões portais e sinusoidais. Nos animais infectados a marcação da fibronectina foi observada com maior intensidade em relação ao grupo controle (Figura 6A-C). Houve um aumento significativo da deposição de FN nos animais infectados dos grupos sintomáticos e assintomáticos em relação aos do grupo controle (ANOVA  $p < 0,0001$ ). Nos animais do grupo sintomático este aumento foi mais acentuado e significativo ( $p < 0,001$ ; teste T Tukey) quando comparado aos grupos de animais assintomáticos e controles. Também, houve diferenças estatísticas significativas quando comparamos a deposição de FN entre todos os grupos (Gráfico 8 – pág.47 ).



**Figura 6A-C:** Cortes histológicos congelados de fígado de cães controle e de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Cão Controle: Presença discreta de fibronectina no lóbulo hepático; (B) Cão assintomático: Marcação positiva para fibronectina no lóbulo hepático. Observar no centro da figura forte marcação ao redor de um ramo de um grande vaso portal; (C) Cão Sintomático: Marcação exuberante e difusa no lóbulo hepático. Imunofluorescência para detecção de fibronectina. Todas as Barras 50=μm.



**Gráfico 8.** Análise morfométrica da deposição de fibronectina no fígado

### 4.3 - Baço

#### 4.3.1 - Macroscopia

Em geral, as alterações macroscópicas observadas nos cães dos grupos sintomáticos e assintomáticos foram o aumento de volume do órgão (esplenomegalia), o espessamento das bordas, o aspecto rugoso e irregular da superfície e a coloração vermelho-escura sugerindo um quadro de congestão. Ao corte este fato se comprovava, pois a polpa vermelha era friável e muitas vezes difluente. A polpa branca, na grande maioria dos casos, era facilmente visualizada como pontos de coloração brancacenta, de tamanho variando de 0,2 a 0,5 cm de diâmetro, distribuídos difusamente na superfície do órgão, indicando a hipertrofia e hiperplasia dos folículos de Malpighi (hiperplasia folicular).

O peso relativo do baço dos animais assintomáticos e sintomáticos e dos cães do grupo controle estão demonstrados na Tabela 3. Não houve diferença estatística em relação ao peso relativo do baço entre os animais dos grupos



assintomáticos e sintomáticos. Entretanto, houve diferença significativa dos pesos relativos dos baços desses dois grupos quando comparados ao controle.

**Tabela 3-** Peso relativo (peso do baço/peso corporal) dos baços dos animais dos grupos assintomáticos, sintomáticos naturalmente infectados com *L.chagasi* e do grupo controle.

<b>Grupos</b>	<b>Peso relativo (%) (média ± SR)</b>
<b>Controle</b>	0,107 ± 0,0234 <sup>b</sup>
<b>Assintomático</b>	0,215 ± 0,0596 <sup>a</sup>
<b>Sintomático</b>	0,224 ± 0,0734 <sup>a</sup>

Os resultados expressos como médias dos valores ± erro padrão. As diferenças estatisticamente significativas referem-se às letras a,b. ANOVA p<0,0001.

**Nota:** Foram mensuradas três medidas de cada órgão: o comprimento e duas larguras (extremidades maior e menor).

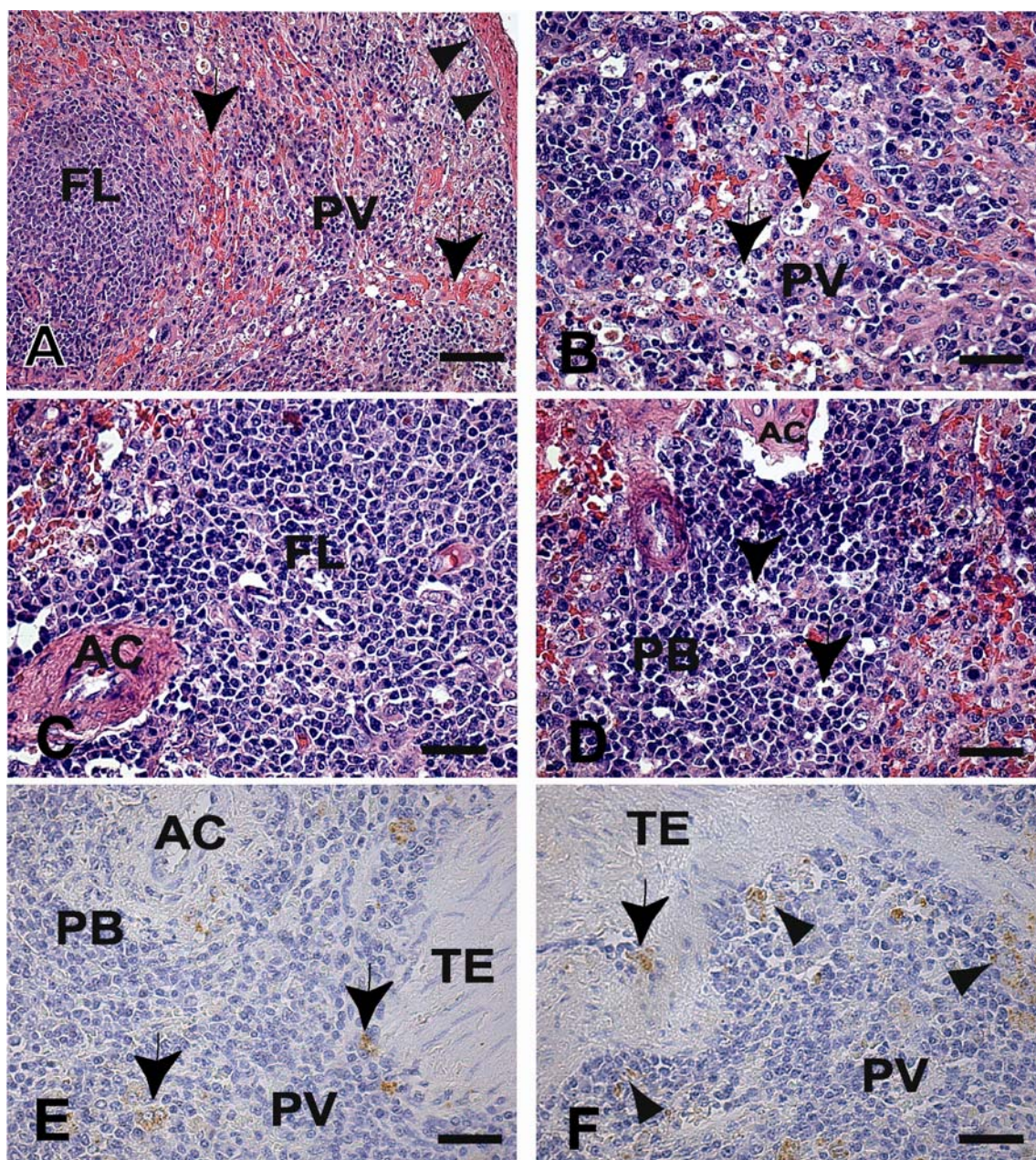
#### 4.3.2 - Microscopia

As alterações histopatológicas observadas no baço dos cães foram o espessamento e inflamação da cápsula, a hiperplasia e hipertrofia da polpa branca e da polpa vermelha, a congestão da polpa vermelha, a deposição de pigmentos de hemossiderina e a depleção da bainha periarteriolar na polpa branca, em alguns casos (Figura 7A-D).

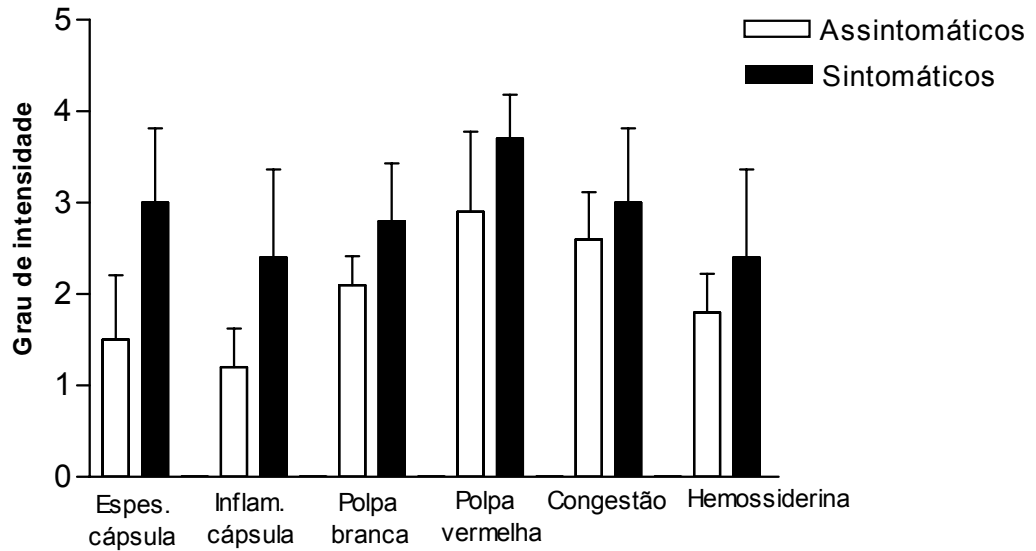
Em geral, os fragmentos de baço analisados apresentaram espessamento e inflamação da cápsula, com graus variados de intensidade. A polpa branca era evidente apresentando folículos linfóides constituídos por células dispostas em diferentes camadas, de acordo com sua afinidade tintorial. As células mais centrais eram claras com núcleos vesiculosos e citoplasma acidófilo contendo ou não parasitos. As células mais periféricas eram mais escuras evidenciando seus núcleos bem corados pela Hematoxilina. Interessantemente, esse quadro de hiperplasia e hipertrofia da polpa branca foi mais intenso no grupo dos animais sintomáticos.

A polpa vermelha sofreu modificações, em decorrência do aumento considerável do número de células, tanto de macrófagos marginais dos seios quanto dos cordões de Billroth e da pronunciada neoformação conjuntiva (fibroblastos jovens e fibrócitos), levando, no conjunto, à redução da luz dos

seios. Todos os cães dos grupos sintomáticos e assintomáticos analisados apresentaram quadro de hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha. Parasitos imuno-marcados foram facilmente visualizados nos macrófagos sinusoidais (Figura 7E,F). A congestão dos seios medulares e a presença de pigmentos de hemossiderina (confirmado pela coloração do Azul da Prússia) foi um achado freqüente nos cães do grupo de sintomáticos. As lesões foram analisadas de forma semi-quantitativa, classificadas como alterações discretas, moderadas e intensas como mostra o Gráfico 9 (pág. 51).

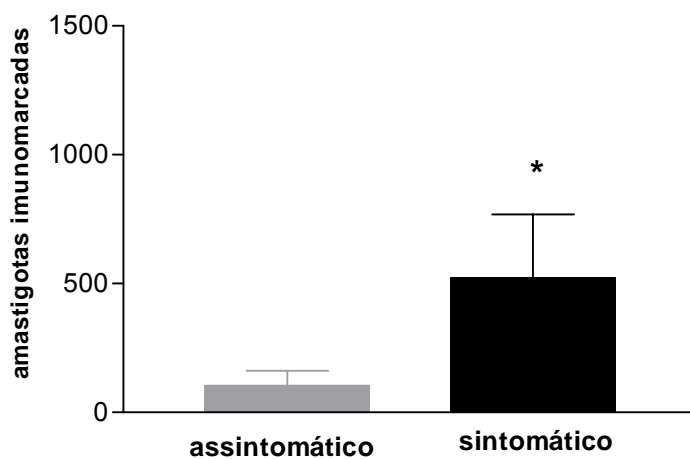


**Figura 7** – Cortes Histológicas de baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A,B,C) Cão Assintomático: (A) observar cápsula espessada (cabeças de seta), polpa vermelha congestionada (setas) e polpa branca reativa, apresentado folículo linfóide evidente. (B,C) detalhes da figura anterior, sendo em (B) região da polpa vermelha contendo macrófagos hipertróficos e vacuolizados, sendo alguns deles repletos de formas amastigotas de *Leishmania* (setas). Em (C): detalhe das células do folículo linfóide (polpa branca reativa). (D) Cão Sintomático: folículo linfóide sem formação de centro germinativo e com diminuição numérica de linfócitos, sendo esses substituídos por macrófagos intensamente parasitados por formas amastigotas de *Leishmania* (setas). (E,F) Cão Assintomático: Notar a presença de formas amastigotas imunomarcadas na polpa vermelha (setas); e em (F) observar parasitos na intimidade da trabécula esplênica (cabeças de seta) e nos macrófagos localizados no interior da mesma (seta). (A-D) Hematoxilina-Eosina; (E-F) Estreptoavidina-Peroxidase. Barras (A) Barra = 32 $\mu$ m ; (B,C,D,E,F) (Barra = 16 $\mu$ m). FL (Folículo Linfóide); PB (Polpa Branca); PV (Polpa Vermelha); AC (Arteriola Central); TE (Trabécula Esplênica).



**Gráfico 9** - Alterações histopatológicas observadas no baço de cães naturalmente infectados, sintomáticos e assintomáticos.

A presença de amastigotas de *Leishmania*, avaliado pela imuno-histoquímica, e amastigotas e determinado pela contagem de parasitos por um determinado número de campos foi analisado pelo Teste T não pareado mostrou diferença significativa entre os grupos de cães sintomáticos e assintomáticos ( $p=0,0014$ ) (Gráfico 10).



\*  $p < 0,05$ , teste T não pareado

**Gráfico 10** – Número de amastigotas marcadas por imuno-histoquímica no baço entre grupo de cães sintomáticos e assintomáticos, (\* $p = 0,0014$  Teste T não pareado).

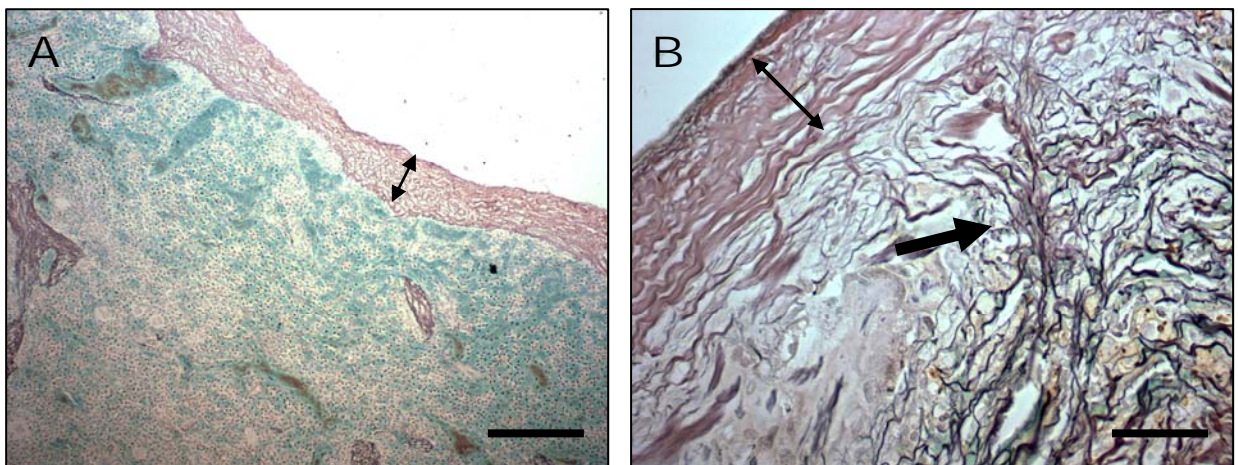


### 4.3.3 Avaliação das fibras colágenas (reticulares) esplênicas pela Prata amoniacal de Gomori

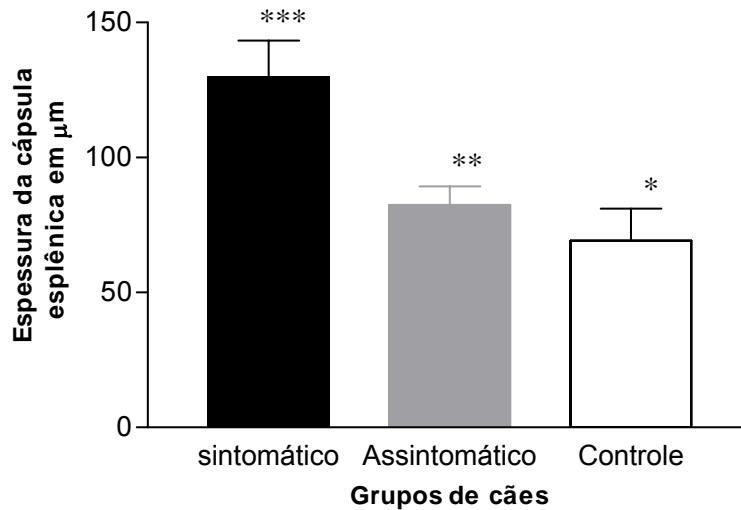
As principais alterações da matriz intersticial encontradas no baço dos cães dos grupos sintomático e assintomático foi o aumento significativo, tanto da espessura, quanto da quantidade de colágeno depositado na cápsula, assim como o aumento da deposição de fibras reticulares no parênquima esplênico quando comparamos ambos os grupos com o grupo controle.

#### 4.3.3.1- Espessura da cápsula esplênica

A análise estatística da espessura das cápsulas esplênicas pelo teste ANOVA demonstrou que houve diferença significativa na deposição de colágeno entre os três grupos ( $p < 0,001$ , ANOVA, Gráfico 11). Entretanto, nos cães do grupo sintomático foi onde observamos este aumento mais acentuado (Figura 8 A,B).



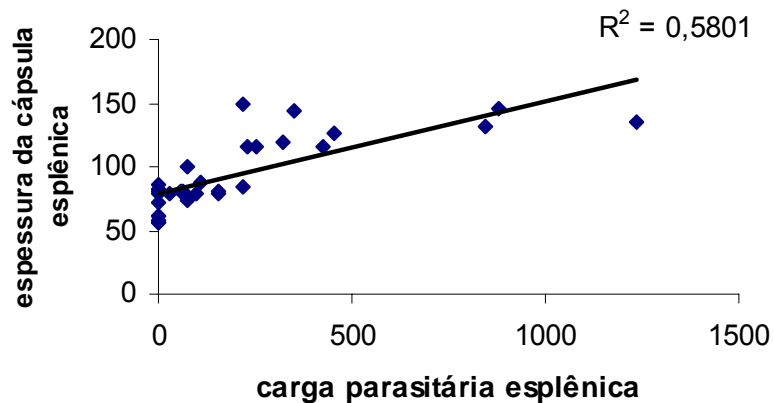
**Figura 8** – Cortes histológicos parafinados de baço de cães controle e naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: (A) Cão controle: Observar a espessura de cápsula de acordo com a seta dupla; (B) Cão Sintomático: Notar um evidente espessamento da cápsula (seta dupla), sendo essa formada por fibras colágenas (reticulares) espessadas e dispostas em várias direções (seta larga). Prata Amoniactal de Gomori. (A) Barra= 64 $\mu$ m; (B) Barra = 16 $\mu$ m.



**Gráfico 11** - Espessura da cápsula esplênica nos grupos estudados. Prata Amoniacal de Gomori, (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; \*  $P < 0.05$ , Teste T de Tukey).

#### 4.3.3.2 - Correlação entre o parasitismo esplênico e a espessura da cápsula do baço

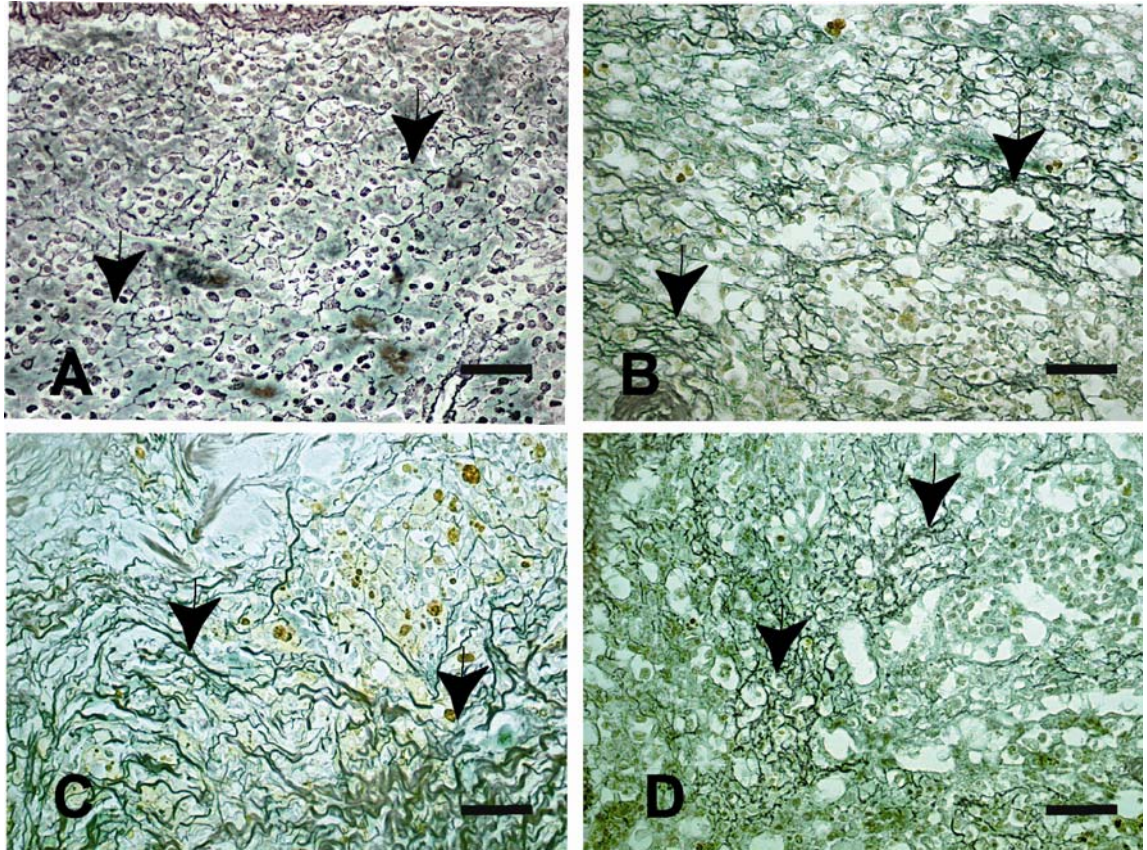
A espessura da cápsula mostrou correlação positiva e significativa, com o parasitismo do baço (Gráfico 12) (Teste de correlação de Pearson;  $r = 0,7617$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Gráfico 12** - Correlação entre o parasitismo esplênico de cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* (avaliado por imunohistoquímica) e a espessura da cápsula do baço (Prata Amoniacal de Gomori).

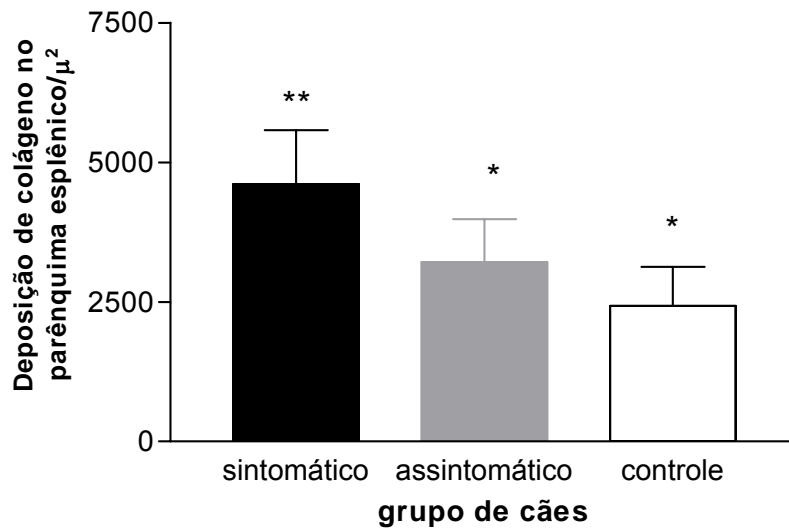
#### **4.3.3.3 - Deposição de colágeno (fibras reticulares) no parênquima esplênico**

O baço dos animais sintomáticos e assintomáticos apresentaram maior depósito de fibras reticulares distribuídos por todo o parênquima esplênico, assim como as fibras mais espessadas em relação aquelas observadas no baço dos animais controles (Figura 9A-D). Houve diferença estatística significativa entre os grupos sintomáticos e assintomáticos ( $p < 0,0001$ , ANOVA; teste T  $p < 0,01$ ). Também, observamos significância entre os animais do grupo sintomático e controle. Assim, não houve diferença apenas quando comparamos a deposição das fibras reticulares entre os grupos de cães assintomáticos e controle (Gráfico 13 – pág. 56).



**Figura 9A-D:** Cortes histológicos parafinados de baço de cães controle (A) e cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (B,C,D): (A): Cão Controle. Notar delicada rede de fibras reticulares (setas). (B): Cão assintomático: Fibras colágenas mais proeminentes podem ser observadas (setas); (C,D) Cão sintomático: Fibras reticulares espessadas e mais evidentes podem ser observadas (setas). Prata Amoniacal de Gomori. Todas as Barras = 16 $\mu$ m.



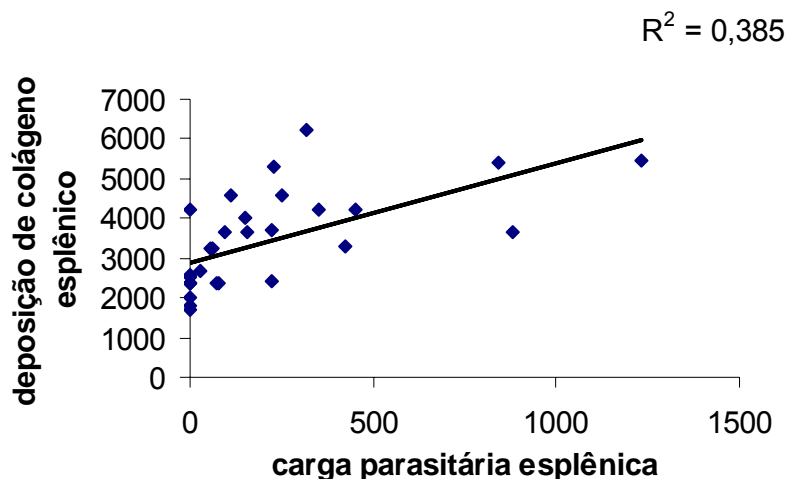


\*\*p<0,001, \*p>0,05, teste T de Tukey

**Gráfico 13** – Deposição de colágeno no parênquima esplênico dos grupos de cães estudados.

#### 4.3.3.4 - Correlação entre o parasitismo esplênico e a deposição de colágeno no parênquima esplênico.

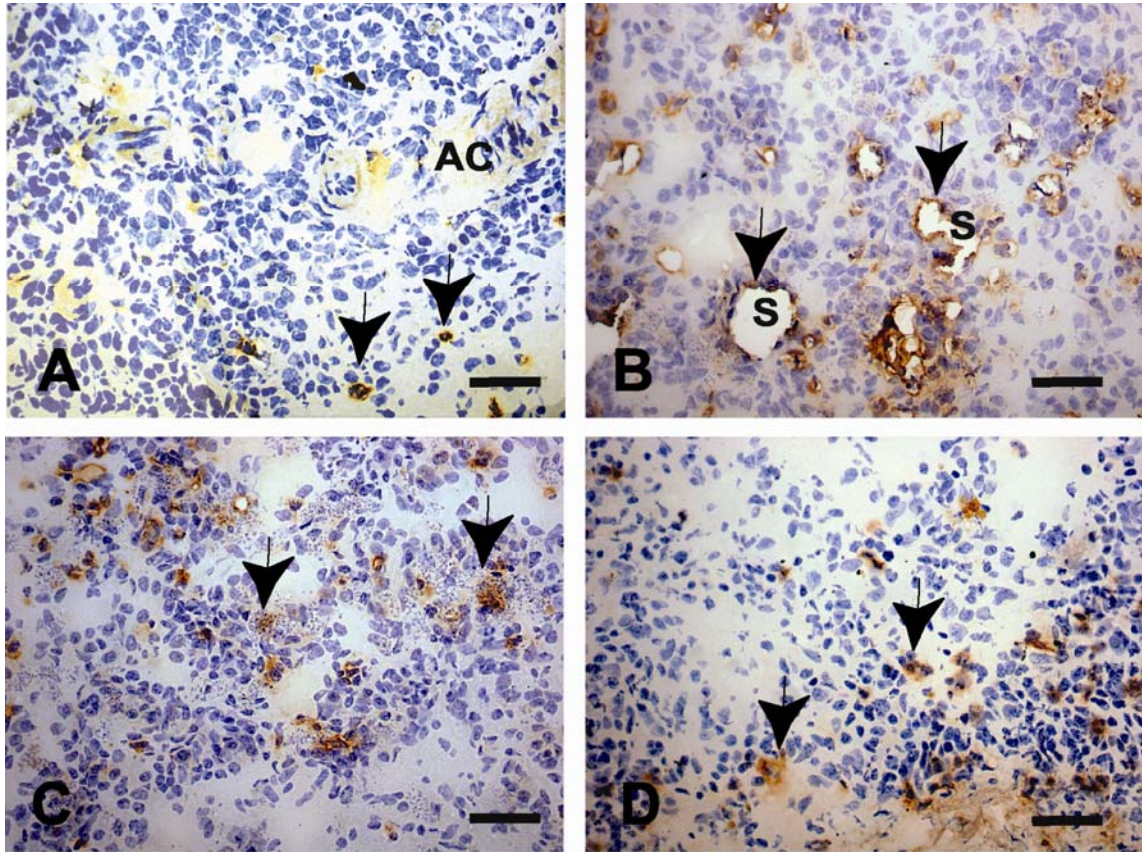
A deposição de colágeno na cápsula corada pela técnica da prata amoniacal de Gomori, mostrou correlação positiva com o parasitismo do baço (Gráfico 14). A correlação foi significativa ao teste de correlação de Pearson ( $r=0,6205$ ,  $p=0,0003$ ).



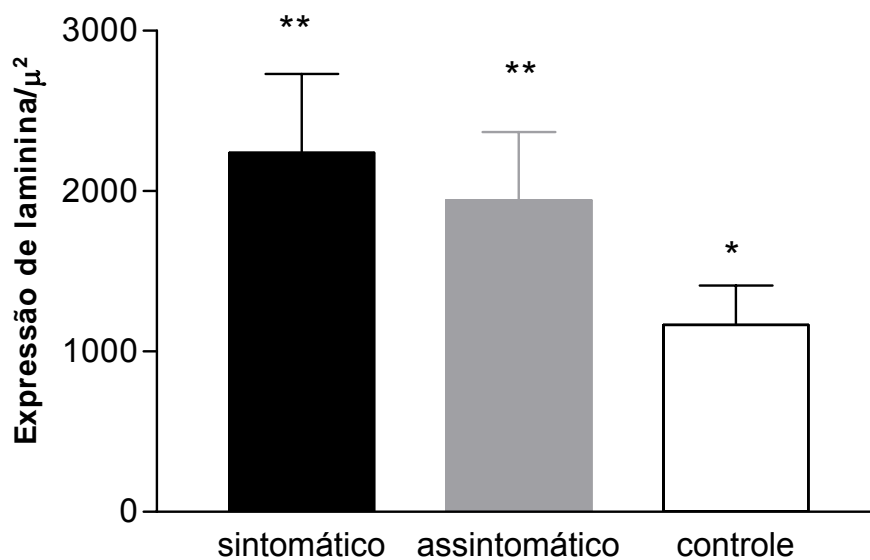
**Gráfico 14** - Correlação entre o parasitismo esplênico de cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* (avaliado por imuno-histoquímica) e a deposição de colágeno na cápsula do baço (Prata Amoniacal de Gomori).

#### **4.3.4 - Avaliação da laminina (LN) esplênica**

A laminina foi encontrada principalmente nas áreas de maior vascularização (Figura 10). Na polpa branca não foi observada marcação de LN, somente em volta dos nódulos e/ou folículos linfóides. Essa marcação foi mais acentuada nos animais do grupo sintomático e assintomático (Figura 10). Houve aumento significativo de LN no parênquima esplênico dos animais dos grupos sintomáticos e assintomáticos em relação aos animais do grupo controle (ANOVA  $p < 0,0001$ ; teste T  $p < 0,001$ ). Entre os grupos de animais sintomáticos com os assintomáticos não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ), como demonstra o gráfico 15, (pág. 59).



**Figura 10A-D** – Cortes congelados de baço de cães controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*. (A) Cão Controle: Expressão da laminina em células da polpa vermelha (setas). (B): Cão Assintomático: Presença de laminina em estruturas vasculares na polpa vermelha; (C,D) Cão Sintomático: Presença de forte marcação em células da polpa vermelha em relação ao controle (A) (setas). Estrepto-avidina-peroxidase para marcação da laminina. (AC) Arteriola Central Todas as Barras = 50  $\mu$ m.

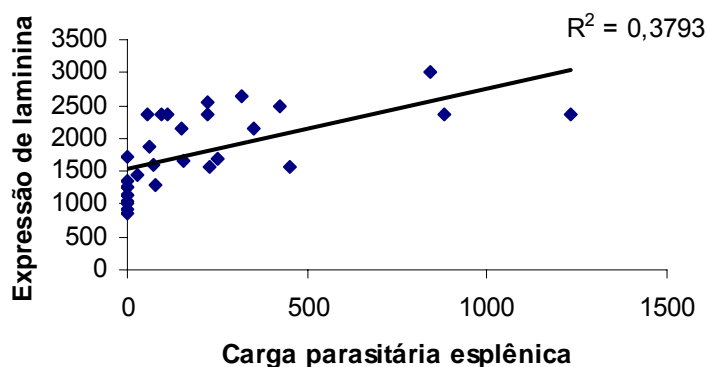


\*\*p<0,001, teste T de Tukey

**Gráfico 15** – Análise morfométrica da expressão de laminina esplênica em cães pela técnica imuno-histoquímica nos diferentes grupos estudados.

#### 4.3.4.1 - Correlação entre a expressão da laminina e o parasitismo esplênico.

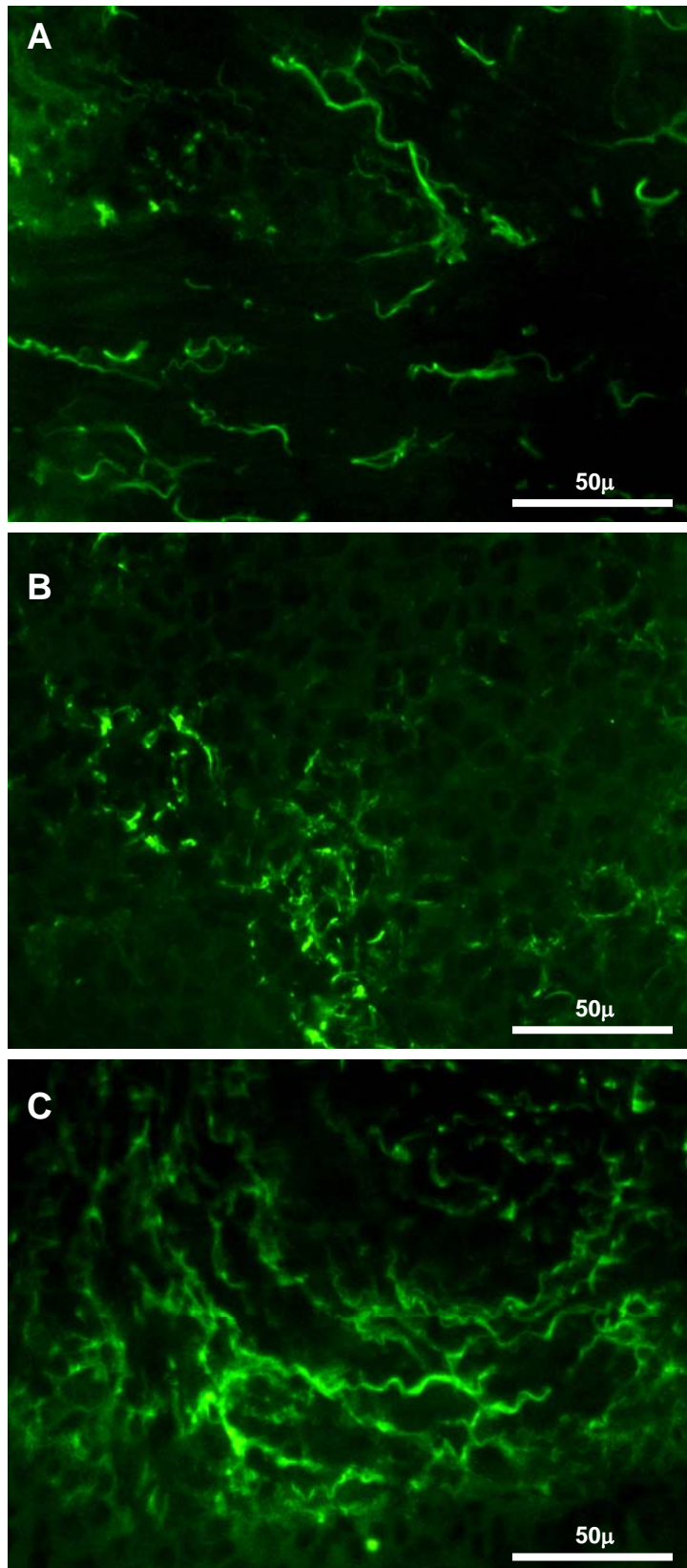
A Correlação entre a expressão da laminina esplênica e a carga parasitária no fígado foi considerada positiva (Gráfico 16), estatisticamente significativa demonstrado pelo teste de correlação de Pearson ( $r=0,6159$ ,  $p=0,0003$ ).



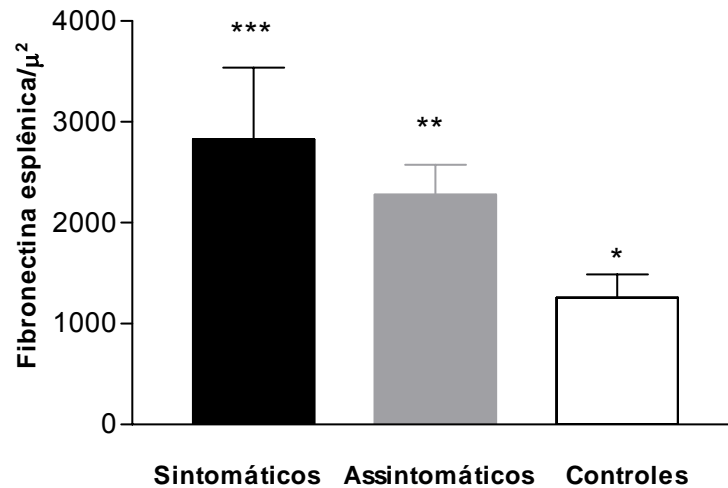
**Gráfico 16** - Correlação entre a carga parasitária esplênica e a expressão da laminina no parênquima esplênico Pearson,  $r=0,6159$ ,  $p=0,0003$ .

#### **4.3.5 - Avaliação da Fibronectina (FN) esplênica**

A fibronectina (FN) esplênica foi detectada em todo o parênquima do órgão, com exceção da polpa branca onde a marcação foi menos evidente. Nos animais sintomáticos e assintomáticos observamos que a deposição de FN era mais acentuada em relação aos animais controles não infectados (Figura 11). Houve um aumento significativo de marcação no parênquima dos baços dos animais dos grupos sintomáticos e assintomáticos em relação aos animais controle (ANOVA  $p < 0,0001$ ; teste T  $p < 0,001$ ) e entre os grupos de animais infectados (sintomáticos e assintomáticos), ( $p < 0,001$ ; Teste T de Tukey), como demonstra o gráfico 17 (pág. 62).



**Figura 11A-C:** Cortes congelados de baço de cão controle (A) e de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (B,C): (A) Cão Controle: Presença discreta de fibronectina no parênquima do baço (polpa vermelha) ; (B) Cão Assintomático: Observar forte marcação positiva para fibronectina no parênquima esplênico no centro inferior da figura.; (C) Cão Sintomático: Marcação exuberante e difusa no parênquima esplênico. Imunofluorescência para detecção de fibronectina Todas as Barras 50=µm .



\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01, Teste T de Tukey

**Gráfico 17** – Análise da morfométrica da expressão de fibronectina esplênica nos diferentes grupos estudados

#### 4.4 - Linfonodo Cervical

##### 4.4.1 – Macroscopia

O motivo de escolha de escolha do linfonodo cervical superficial para estudo nesta pesquisa deveu-se pelo fato de que estes linfonodos nos cães assintomáticos e sintomáticos apresentavam-se em maior tamanho e com maior reatividade em detrimento aos outros inspecionados durante as necropsias e de acordo com a experiência científica do grupo (LIMA et al., 2004).

Em geral, os linfonodos cervicais de todos os animais infectados eram clinicamente palpáveis. À necropsia eles apresentaram aumento de peso e tamanho (linfadenopatia) de superfície lisa e brilhante e ao corte exibiam um líquido fluente de aspecto leitoso, indicando edema do tipo exsudato. A camada cortical do órgão era notável e de fácil discernimento da camada medular, devido à presença de formações nodulares, de coloração brancacenta, sugerindo hiperplasia folicular. Esses nódulos, por sua vez, podiam ser confluentes originando áreas de superfície mais extensas.

Não houve diferença estatística em relação ao peso relativo do órgão entre os grupos sintomáticos e assintomáticos avaliados (p<0,05; Test T de Tukey). A diferença estatística foi observada quando comparamos cada um dos



grupos de animais infectados, sintomáticos ou assintomáticos com os linfonodos cervicais de animais controles ( $p < 0,05$ ; teste T de Tukey). (Tabela 4)

**Tabela 4** - Peso relativo (peso do linfonodo cervical/peso corporal) dos linfonodos cervicais dos cães do grupo assintomático, sintomático e naturalmente infectados com *L. chagasi* e do grupo controle.

<b>Grupos</b>	<b>Peso relativo (%) (média ± SR)</b>
<b>Controle</b>	0,0130 ± 0,0045 <sup>a</sup>
<b>Assintomático</b>	0,0395 ± 0,0039 <sup>b</sup>
<b>Sintomático</b>	0,0399 ± 0,0116 <sup>b</sup>

Os resultados expressos como médias dos valores ± erro padrão. As diferenças estatisticamente significativas referem-se às letras a,b. ANOVA  $p = 0,0253$ .

#### **4.4.2 - Microscopia**

As alterações mais marcantes foram a linfadenite capsular, a inflamação dos seios subcapsulares, a hiperplasia e hipertrofia dos nódulos linfóides, a hiperplasia e hipertrofia das células dos cordões e seios medulares (principalmente macrófagos) e a congestão dos vasos nos cordões e seios medulares com ou sem a presença de pigmentos de hemossiderina (Figuras 12A,B,C e D).

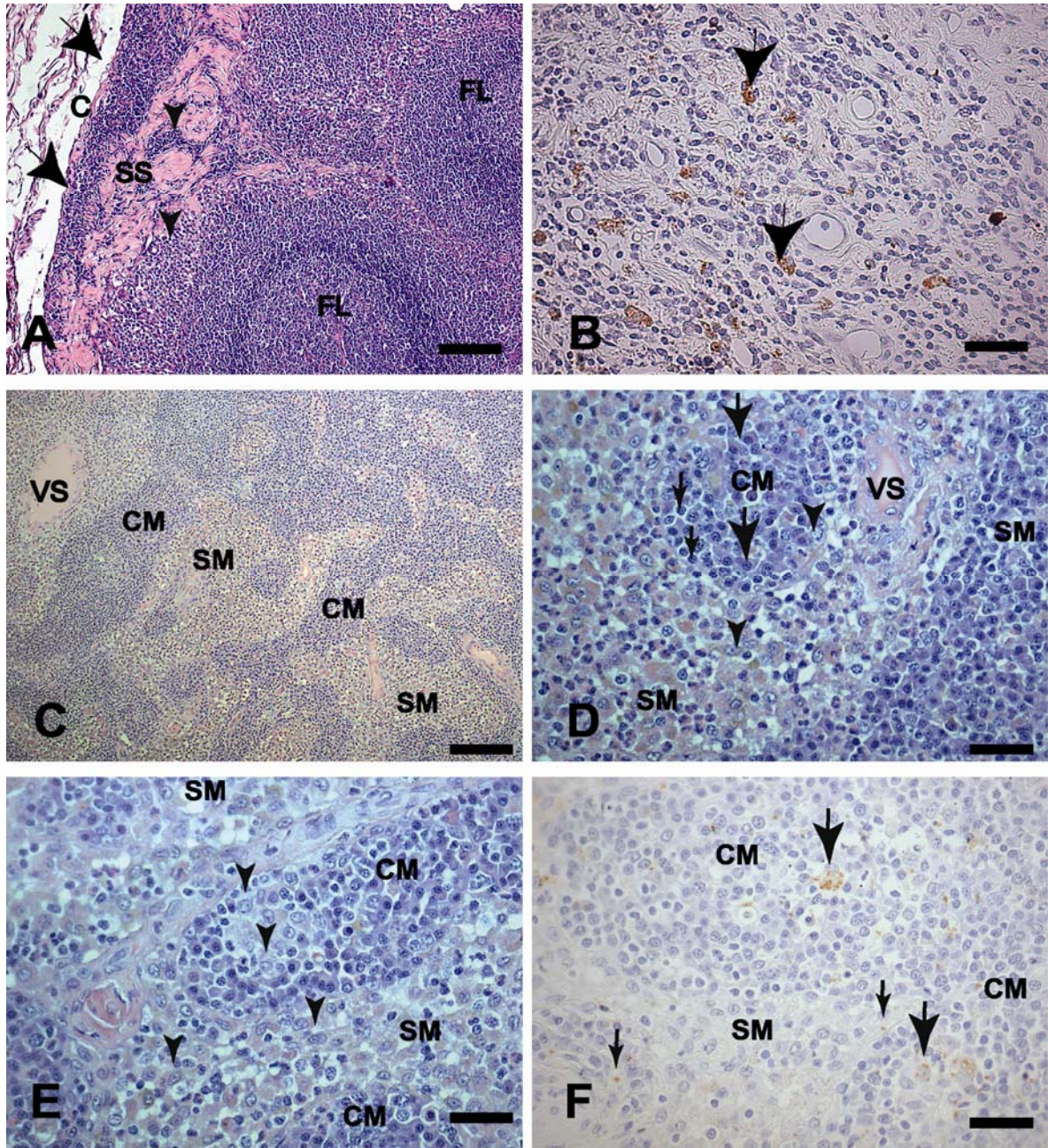
A linfadenite capsular e o aumento da celularidade dos seios subcapsulares, com graus variados de intensidade foram achados freqüentes nos cães assintomáticos e sintomáticos. Houve diferença significativa entre os grupos estudados, assim como houve diferenças entre os grupos sintomáticos e assintomáticos para os parâmetros congestão e deposição de hemossiderina como mostra o Gráfico 18 ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis).

Em relação aos nódulos linfóides observou-se reação folicular com formação de centro germinativo. Não raro, os folículos linfóides eram coalescente, em correspondência ao observado à macroscopia, e as células centrais apresentavam-se claras, com núcleo vesiculosos e citoplasma amplo. A área periférica era constituída de células pequenas com cromatina densa características de linfócitos. Observou-se também reação intensa da cortical profunda, paracortical, levando a formação de verdadeiros mantos constituídos de células mononucleares com núcleos densos e células fusiformes com

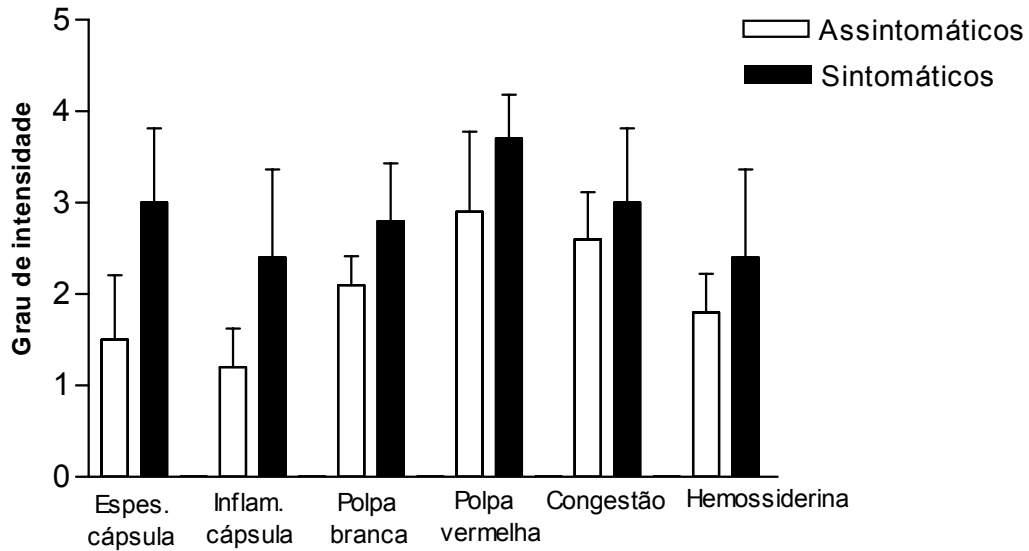


prolongamentos citoplasmáticos, sugerindo serem células dendríticas. Um outro achado freqüente foi hiperplasia e hipertrofia de macrófagos dos seios e cordões medulares, associada à presença de áreas eosinofílicas, acelulares e amorfas indicando líquido de edema do tipo exsudato.

Não houve diferença significativa entre os grupos analisados em relação à hiperplasia e hipertrofia dos cordões medulares e dos nódulos linfóides (Gráfico 18) (pág. 66)



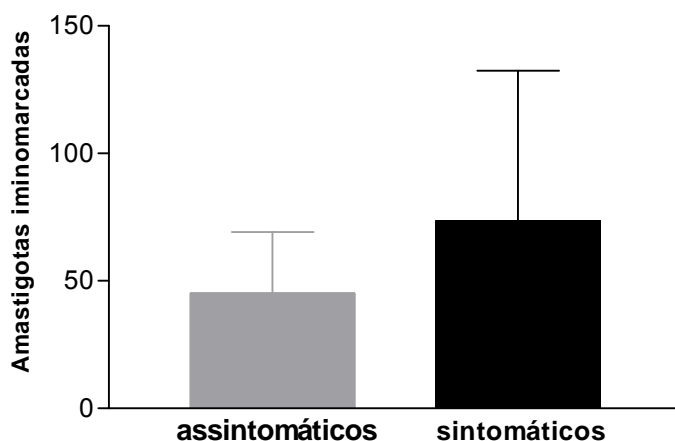
**Figura 12A-F** Cortes histológicas parafinadas de linfonodos cervicais de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: (A,B) Cão Assintomático: (A) Observar cápsula espessada (setas), seios subcapsulares com células inflamatórias (cabeças de setas) e região da cortical exibindo folículos linfóides; e em (B) Presença de inúmeras formas amastigotas na espessura da cápsula (setas); (C,D,E,F) Cão Sintomático: (C) Visão panorâmica da região da medular exibindo hipertrofia e hiperplasia das células dos cordões e dos seios. Em (D) detalhe da figura anterior mostrando predominância de plasmócitos (setas grandes), macrófagos (cabeças de seta) e linfócitos (setas pequenas). Em (E) observar macrófagos hipertróficos com núcleos vesiculosos e citoplasma abundante; e em (F) Macrófagos parasitados nos cordões (setas grandes) e seios (setas pequenas). (A,C) Hematoxilina-Eosina. Barras = 32 $\mu$ m ; (B,F) Estreptoavidina-imunoperoxidase. Barra = 16 $\mu$ m; (D,E) Barra = 16 $\mu$ m. C (Cápsula); SS (Seios Subcapsulares); FL (Folículo Linfóide); CM (Cordões Medulares); SM (Seios Medulares); VS (Vasos Sanguíneos).



**Gráfico 18** - Alterações histopatológicas observadas no linfonodo cervical de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, grupos sintomáticos e assintomáticos.

O parasitismo avaliado pela imuno-histoquímica para amastigotas e observado pela contagem de parasitas por um determinado número de campos e analisado pelo Teste T não pareado não demonstrou diferença significativa entre os grupos (Gráfico 19) de cães sintomáticos e assintomáticos ( $p=0,1767$ , Teste T não pareado ).

O número maior de amastigotas imuno-marcadas foi encontrado nos linfonodos cervicais dos cães sintomáticos.



p=0,1767

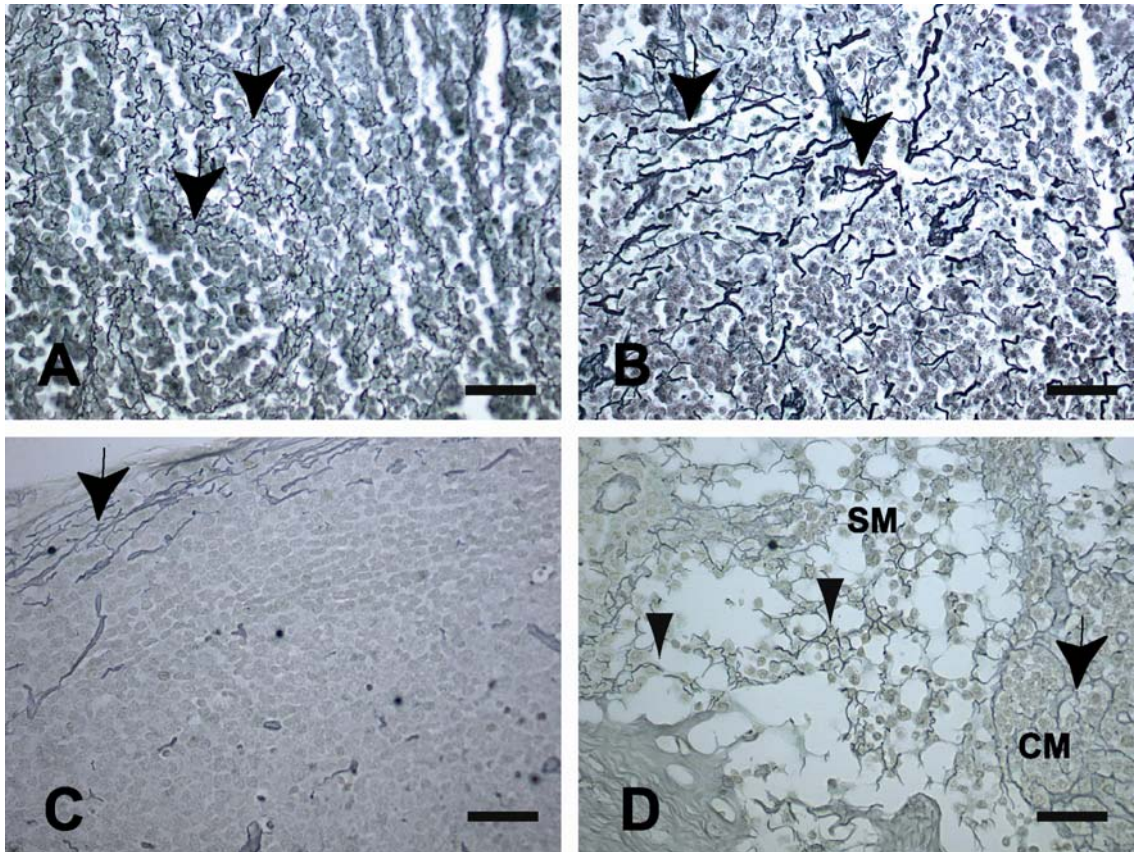
**Gráfico 19** – Número de amastigotas marcadas pela imuno-histoquímica nos linfonodos cervicais nos grupo de cães sintomáticos e assintomáticos não significativos, ( $p = 0,1767$ , Teste T não pareado).

#### 4.4.3 - Avaliação das fibras colágenas dos linfonodos cervicais pela Prata amoniacal de Gomori.

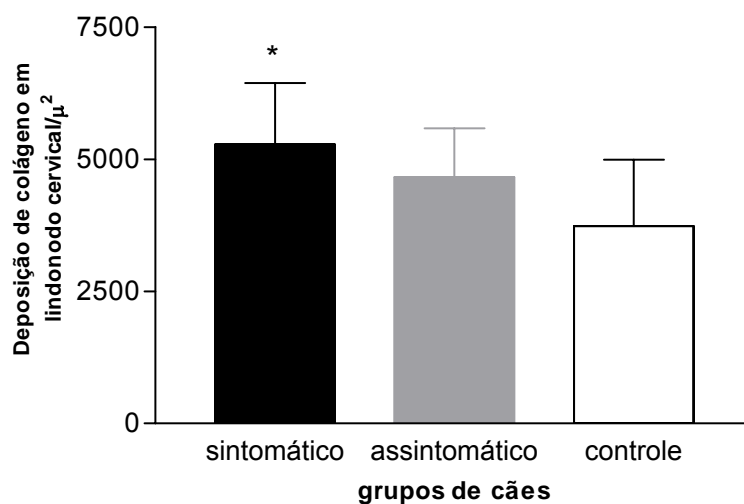
As fibras reticulares nos linfonodos cervicais dos cães infectados, além de uma notável deposição, apresentaram-se mais espessadas e enoveladas em relação ao grupo controle (Figura 13A-D). É importante ressaltar que a fibrilopiose ocorreu, sobretudo, na região medular, pois na da região cortical, onde se concentravam os nódulos linfóides, observamos presença discreta de fibras reticulares (Figura 13C). À medida que se afastava da região, a deposição colagênica era mais intensa, difusa e as fibras apresentavam-se mais espessadas em relação às encontradas nos linfonodos dos animais controles (Figura 13B,D).

A quantificação da deposição de colágeno nos linfonodos cervicais nos diferentes grupos estudados, analisados pela ANOVA mostrou diferença estatística significativa entre os grupos sintomáticos e controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças estatísticas significativas quando comparamos os grupos cães assintomáticos e controle, nem entre assintomáticos e sintomáticos (Gráfico 20 – pág. 69).





**Figura 13A-D:** Cortes histológicos parafinados de linfonodo cervical de cães controle (A) e cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* (B,C,D): (A): Cão Controle. Notar delicada rede de fibras reticulares (setas) na região da cortical. (B,C,D):Cão sintomático: (B) Fibras colágenas mais proeminentes podem ser observadas (setas) na região da cortical; Em (C) Cápsula com fibras reticulares espessadas e bem evidentes podem ser observadas (seta), e em (D) fibras reticulares evidenciadas nos seios (cabeças de setas) e cordões (setas) medulares. Prata Amoniaca de Gomori. Todas as Barras = 16µm.



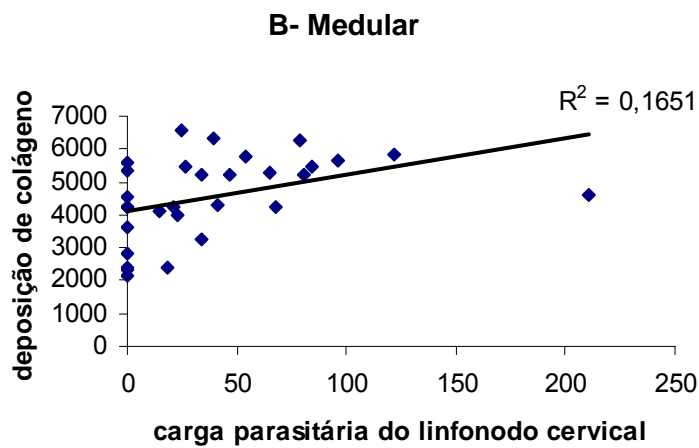
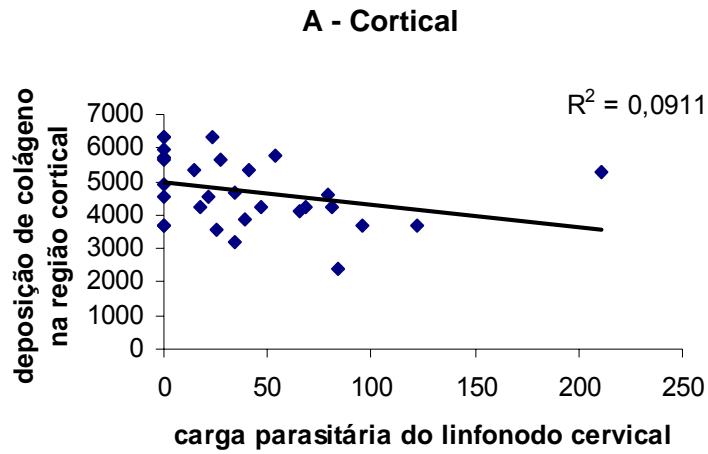
\* $p < 0,05$ , teste T de Tukey.

**Gráfico 20** – Deposição de colágeno no parênquima de linfonodo cervical (região cortical e paracortical) nos diferentes grupos de cães estudados. Prata Amoniacal de Gomori, (\* $p = 0,0265$ ).

#### 4.4.3.1 - Correlação entre o parasitismo do linfonodo cervical e a deposição de colágeno.

A avaliação da deposição de colágeno da região cortical corada pela técnica da prata amoniaca de Gomori demonstrou correlação negativa em relação à carga parasitária do órgão (Gráfico 21 - A). A correlação não foi considerada significativa ao teste de correlação de Pearson ( $r = -0,3018$ ,  $p = 0,1050$ ) (Gráfico 19).

Por outro lado, houve correlação positiva entre a deposição de colágeno na região medular e a carga parasitária nos linfonodos (Gráfico 21 – B). Esta correlação foi considerada significativa ao teste de correlação de Pearson ( $r = 0,4064$ ,  $p = 0,0259$ ).



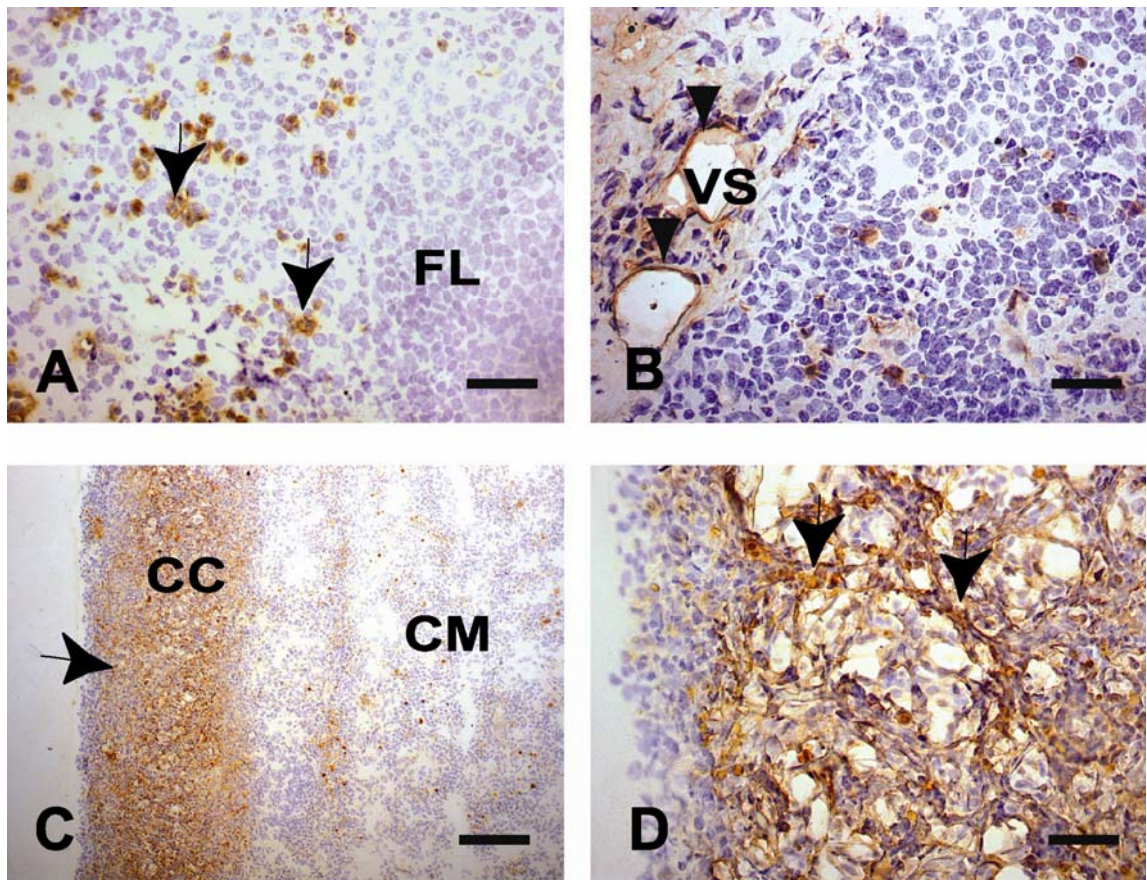
**Gráfico 21** - Correlações entre o parasitismo dos linfonodos cervicais de cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* (avaliado por imuno-histoquímica) e a deposição colagênica; A - Região cortical. B – Região medular dos linfonodos cervicais (Prata Amoniacal de Gomori).

#### **4.4.4 - Expressão da Laminina (LN) no linfonodo cervical**

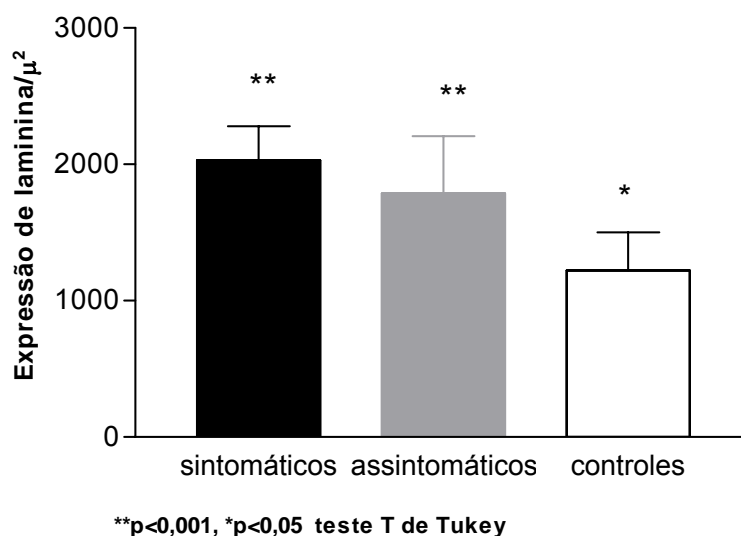
A laminina imuno-marcada nos linfonodos cervicais foi encontrada principalmente na região subcapsular (células e matriz) circundando os folículos (Figura 14A-D). Nos animais infetados houve maior marcação na membrana basal dos vasos o quais se apresentavam ectásicos (Figura 14B).

A quantificação da laminina nos linfonodos cervicais mostrou aumento significativo da expressão da laminina nos animais do grupo sintomáticos e assintomáticos em relação aos animais do grupo controle (ANOVA  $p < 0,0001$ , teste T  $p < 0,001$ ). Quando comparamos a expressão da laminina nos linfonodos dos grupos de animais sintomáticos e assintomáticos não houve diferença estatística entre eles ( $p > 0,05$ ), como demonstra o gráfico 22, (pág. 73)





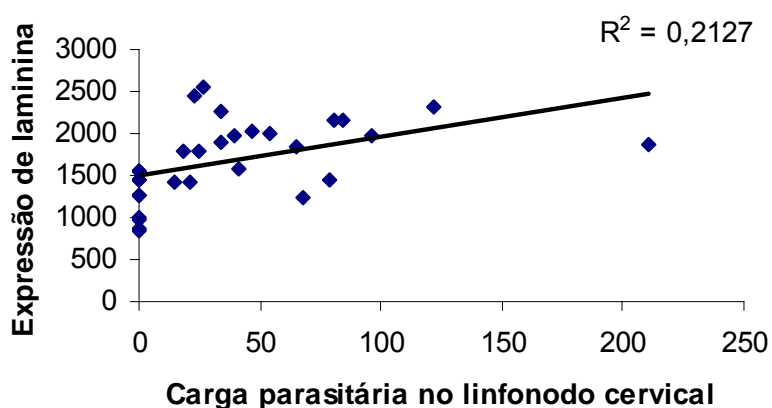
**Figura 14A-D:** – Cortes congelados de linfonodo cervical de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A,B) Cão Assintomático: Imunomarcação da laminina em células da região subcapsular (setas) e em células da parede dos vasos (cabeças de seta). (C,D): Cão Sintomático: (C) Observar inúmeras células marcadas na região da subcapsular e cortical (seta), (D) Detalhe da figura anterior evidenciando a forte expressão de laminina (setas) Estrepto-avidina-peroxidase. (FL) Folículo Linfóide; (VS) Vasos Sanguíneos; (CC) Camada Cortical; (CM) Camada Medular Barras = 50  $\mu$ m .



**Gráfico 22** – Análise morfométrica da expressão de laminina nos linfonodos cervicais de cães pela técnica imuno-histoquímica nos diferentes grupos estudados.

#### 4.4.4.1 - Correlação a expressão da laminina (LN) e parasitismo no linfonodo cervical.

A Correlação entre a deposição da laminina hepática e a carga parasitária no fígado foi considerada positiva (Gráfico 23), estatisticamente significativa demonstrado pelo teste de correlação de Pearson ( $r=0,4612$ ,  $p=0,0103$ ).

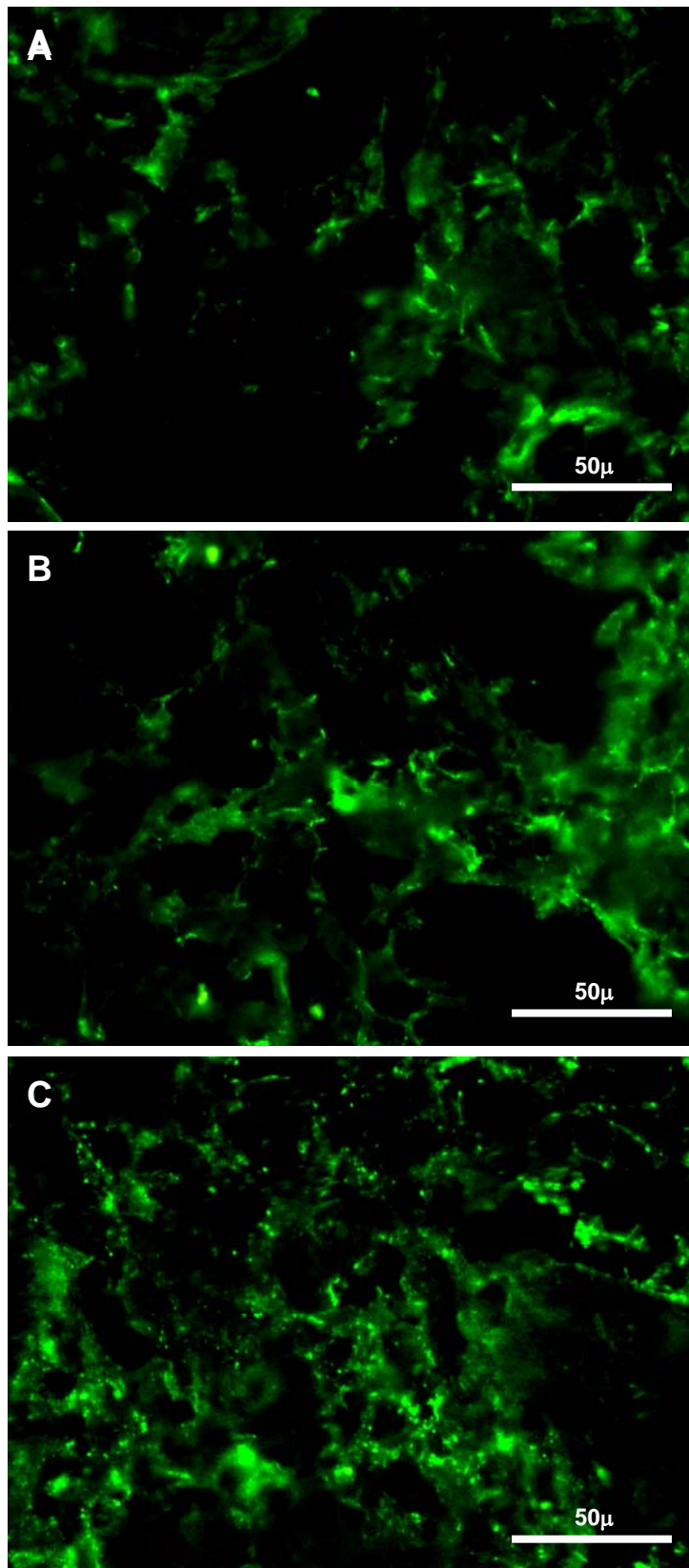


**Gráfico 23** - Correlação entre o parasitismo dos linfonodos cervicais de cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* e a carga parasitária. Pearson ( $r=0,4612$ ,  $p=0,0103$ ).

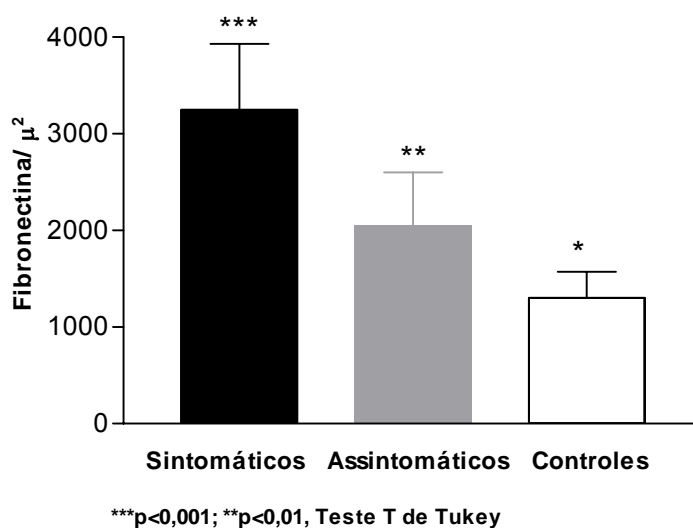
#### 4.4.5 - Avaliação da Fibronectina (FN) no Linfonodo cervical.

A expressão da fibronectina (FN) foi mais evidente na medular dos linfonodos cervicais dos animais infectados com *Leishmania*. Nos animais controles essa marcação era mais discreta ou pouco evidente (Figura 15 A,B e C). A marcação da FN na região cortical dos linfonodos foi observada, principalmente, em volta dos folículos linfóides.

Os resultados da quantificação da FN nos linfonodos cervicais demonstraram aumento significativo da expressão da FN nos animais infectados em relação aos animais do grupo controle (ANOVA  $p < 0,0001$ ; teste T;  $p < 0,001$ ). A expressão de FN entre os grupos de animais sintomáticos e assintomáticos mostrou que houve diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,001$ ), como demonstra o gráfico 24 (Pág. 76)



**Figura 15** – Imunofluorescência para detecção de FN no Linfonodo cervical. A - Cão controle. B - Fibronectina no linfonodo cervical de cão assintomático. C - Fibronectina em linfonodo de cão sintomático.



**Gráfico 24** – Análise morfológica da expressão de Fibronectina nos linfonodos cervicais de cães nos diferentes grupos estudados.

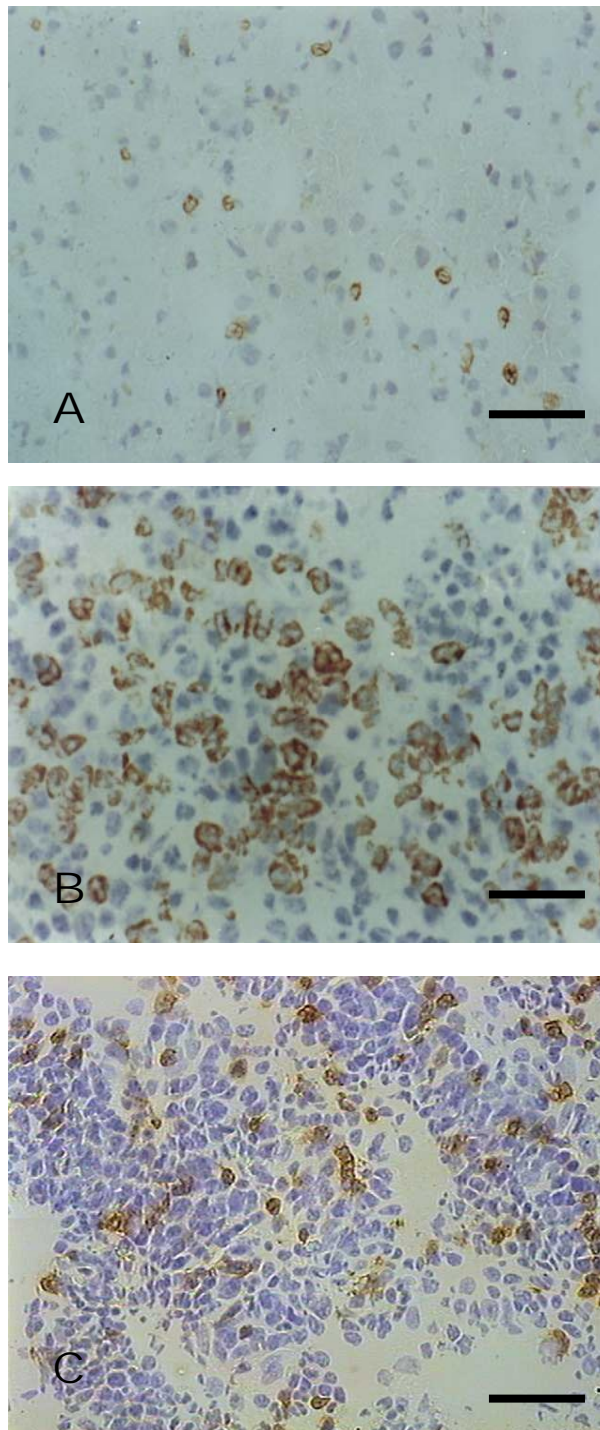
#### 4.4.6 - Caracterização do infiltrado inflamatório nos órgãos

Houve um aumento do número de células marcadas nos órgãos (Figura 16) entre animais infectados. A maior expressão de CR3 em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* foi demonstrada qualitativamente no baço de animais naturalmente e experimentalmente infectados com *L. chagasi*. Nos animais sintomáticos essa expressão era maior quando comparados aos assintomáticos.

Observamos uma maior expressão de CR3 nos diversos órgãos estudados nos cães naturalmente infectados em relação aos controles. A expressão de CR3 foi medida através da contagem do número de células encontradas nos órgãos dos animais acometidos (dados não mostrados).

No baço, o padrão de marcação das células CR3 era ao redor da polpa branca (zona marginal) e na polpa vermelha, com marcação celular superficial de CR3 (marcação de membrana celular). No fígado, as células imunomarcadas estavam distribuídas no lóbulo hepático e no espaço porta e ao redor do parênquima hepático. Nos linfonodo cervicais a células CR3 positivas encontravam-se, predominantemente, na região dos cordões medulares.





**Figura 16** – Cortes histológicos congelados de fígado, baço e linfonodo de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Expressão celular de CR3 (CD11b) no nas células sinusoidas (macrófagos); (B) Expressão celular de CR3 (CD11b) na polpa vermelha (macrófagos); (C) Expressão celular de CR3 (CD11b) nos cordões e seios medulares (macrófagos). Estrepto-avidina-peroxidase. Todas as Barras = 16µm.

## 5 – DISCUSSÃO

---

A Leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de caráter crônico e de grande importância epidemiológica, sendo o cão o principal reservatório urbano para a doença humana (MARZOCHI et al., 1994; ASHFORD, 2000). Os estudos relacionados à patogênese da doença canina têm se intensificado com intuito de um melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos na formação dos sinais clínicos e lesões apresentadas pelos animais infectados (CHAGAS, 1938; DEANE E DEANE, 1955; CIARAMELLA et al., 1997; PALATINIK et al., 2004; GUIANETTI, et al., 2006).

Atualmente, os cães são considerados os principais mantenedores e disseminadores da *Leishmania chagasi* no meio urbano. A LVC caracteriza-se por apresentar um largo espectro de lesões que varia desde a infecção inaparente até uma forma clínica grave, que normalmente leva à morte do animal. As principais manifestações clínicas são as lesões de pele, hipertrofia generalizada dos linfonodos, hepatoesplenomegalia e perda de peso (FERRER, 1992).

Um amplo espectro de lesões e alterações histopatológicas pode ser observado durante a infecção pela *L. chagasi*. Em cães, as alterações associadas à pele, como descritas na literatura, foram amplamente encontradas, destacando-se a descamação seca (55 %) e a alopecia (40 %). Além disso, quando consideramos as alterações da pele em conjunto (descamação, alopecia, seborréia e ulcerações), essas passam a ser predominantes, o que está de acordo com o descrito por Ciaramella et al., (1997); Ferrer et al., (1999), Lima et al., (2004), Giunchetti et al., (2006) e Moura et al., (2008). A dermatite esfoliativa observada estava associada à formação de caspas de coloração brancacenta acometendo principalmente a região das orelhas, cabeça e extremidades. Nesses casos a alopecia (perda de pêlos parcial ou completa) foi um achado comumente associado.

No fígado dos animais assintomáticos e sintomáticos, em geral, observamos a presença da reação inflamatória crônica, caracterizada pela grande presença de infiltrado de células mononucleares nos espaço-porta e no parênquima hepático (lóbulos). O exsudato inflamatório observado formava

arranjos especiais, que são caracterizados por alguns autores como granulomas intralobulares hepáticos. Os granulomas eram mais freqüentes e em maiores quantidades nos animais do grupo de cães assintomáticos. Esse achado é descrito em modelos murinos da leishmaniose visceral (MURRAY et al., 2001), em cães experimentalmente infectados com *L. donovani* e *L. chagasi* (GONZALEZ et al. 1988; OLIVEIRA et al. 1993; TAFURI et al., 1996), em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* (TAFURI et al., 1996 e SANCHEZ et al. 2004).

Estudos realizados por Sanchez et al. (2004) em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* demonstraram diferenças na resposta imunológica observada no baço e fígado. Estes autores relatam que no baço a resposta imune dos cães sintomáticos e assintomáticos foi muito similar. No fígado, entretanto, os cães assintomáticos mostraram uma imunidade efetiva, com granulomas bem formados contendo células T efetoras e numerosas moléculas ativadoras, ao passo que, os animais sintomáticos apresentavam granulomas não organizados compostos por infiltrado de células T, numerosas células de Kupffer parasitadas e baixa expressão de moléculas ativadoras. Estes autores também observaram menor parasitismo no baço, em relação ao observado no fígado. Esses resultados, no entanto, contrastam com os achados de Tafuri et al. (1996); Sant'Ana et al. (2007) e Lima et al., (2007) que ao estudarem cães naturalmente e experimentalmente infectados, observaram granulomas intralobulares bem organizados, no fígado de todos os animais estudados, independente da forma clínica.

A deposição de fibras colágenas avaliadas pela técnica histoquímica Prata Amoniaca de Gomori, no fígado dos cães sintomáticos e assintomáticos estudados esteve aumentada quando comparamos a deposição dessas fibras no fígado dos animais do grupo controle. Esses dados foram estatisticamente significativos. De fato, em todos os animais houve a deposição de fibras colágenas no interior dos lóbulos hepáticos, mesmo que em variado grau de intensidade. Nos fígados dos animais sintomáticos a neoformação conjuntiva era extremamente intensa, sendo que as fibras colágenas distribuíam-se difusamente e em várias direções, mas sem isolar partes do parênquima ou grupos de lóbulos hepáticos como acontece em outras hepatopatias fibrosantes



(Bogliolo, 1956). Essas fibras colágenas mostravam espessuras bem variadas, sendo mais espessadas em determinadas áreas lobulares do que outras. Esse fato poderia indicar que a deposição intralobular estaria em fase evolutiva distinta, mesmo o processo atingindo todos os lóbulos hepáticos. Adicionalmente, o colágeno nos espaço porta hepáticos e o da cápsula de Glisson era proeminente, mas sem indicar continuidade com a fibrose intralobular.

As fibras reticulares intralobulares foram bem evidenciadas pela coloração negra, visualizadas dispostas em várias direções, ora mais espessas ou ora mais delgadas, paralelas, oblíquas ou perpendiculares aos sinusóides, formando uma rede compacta em certos pontos. Em dois casos, as fibras circundavam pequenos grupos de hepatócitos ou mesmo uma só célula, adquirindo o aspecto da cirrose monocelular de Natan-Larrier (1918) e, de modo difuso, principalmente em determinadas áreas, semelhante à cirrose hepática de Rogers (1908). Achados semelhantes aos de Melo et al., (2008). em fígados de animais naturalmente infectados com *L. chagasi*.

O quadro hepático apresentado pelos animais dos grupos de cães assintomáticos e principalmente, nos animais sintomáticos assemelha-se a fibrose intralobular difusa. Entretanto, isso difere da cirrose, pois não há formação de nódulos regenerativos no parênquima hepáticos, constituídos por conjuntivo neoformado que insulam partes do parênquima, grupos de lóbulos ou mesmo parte desses, como ocorre no quadro de cirrose verdadeira, como preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Segundo Corbett et al., (1993) na leishmaniose visceral humana (LVH), além da ativação das células de Ito devido à estase e a persistência do antígeno, a estimulação crônica das células de Kupffer também estimularia uma reação intersticial no espaço de Disse, acompanhada da alta ativação dessas células estreladas. Além disso, o autor ainda discute que tanto a presença de antígenos de *Leishmania* nos espaços de Disse, quanto de Imunoglobulina G (Ig G), estimulariam a síntese e secreção de produtos da matriz.

Nesse trabalho foi encontrada correlação positiva entre a deposição de colágeno hepático nos animais naturalmente infectados e a carga parasitária. Assim, os cães infectados apresentam maior colanogênese hepática (fibrose

intralobular) que está provavelmente estimulada pela presença do parasito, como sugerido por Bogliolo (1956) e Corbett et al., (1993) na leishmaniose visceral humana.

Tanto a expressão de laminina, quanto a de fibronectina no fígado foi maior nos animais sintomáticos e assintomáticos em relação aos animais do grupo controle. Houve diferenças estatísticas entre todos os grupos avaliados, existindo ainda, uma correlação positiva entre a expressão de laminina e fibronectina hepática nos animais naturalmente infectados e a carga parasitária apresentada nesse órgão. A expressão excessiva de laminina e fibronectina no fígado de animais parasitados é um reflexo de processos inflamatórios e degenerativos locais. Alguns trabalhos mostram que tanto a laminina, quanto a fibronectina é secretada durante a regeneração hepática após uma hepatectomia radical ou na cirrogênese. Nesse casos essas fibras assumem um papel importante no processo de capilarização dos sinusóides e remodelação local (MARTINEZ-HERNADEZ et al., 1995).

O perfil bioquímico hepático demonstrou o aumento sérico da atividade das enzimas aminotransferase de aspartato (AST) e Aminotransferase de alanina (ALT) nos animais infectados, principalmente nos sintomáticos. O motivo do aumento pode ser explicado pelas várias injúrias hepáticas causadas por *Leishmania*. Esses resultados corroboram com os estudos de Ferrer et al., (1991) com cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*, o qual verificou o aumento dessas enzimas correlacionado às alterações hepáticas.

A fibrose hepática ou a acumulação progressiva de matriz extracelular (ECM) fibrilar no fígado, é a conseqüência de danos teciduais repetidos devido à infecções (principalmente por vírus B e C), induzida por drogas, causas metabólicas e auto-ímmunes, e à ativação crônica da reação de cicatrização de feridas (Schuppan *et al.*, 1999; Roche, 2000; Valkova, 2002; Pinzani & Rombouts, 2004). A fibrose hepática não resulta somente de mudanças na ECM, mas também de alterações na sua degradação, que significa uma perda do balanço funcional dinâmico entre fibrogênese e fibrólise (Valkova, 2002). Como o fígado torna-se fibrótico, há mudanças quantitativas e qualitativas na composição da ECM. As fontes celulares dos componentes do tecido conjuntivo em fibrose hepática têm sido um tema de controvérsia, mas as

células hepáticas estreladas (HSC) ou células de Ito são provavelmente as que mais contribuem para esse processo, quando o dano hepatocelular é limitado ou concentrado dentro do lóbulo hepático (Pinzani & Rombouts, 2004). Evidências têm sido obtidas que células precursoras circulantes, chamadas fibrócitos do sangue circulante migram para o sítio da lesão, mas ainda não foi demonstrado o seu papel no desenvolvimento de fibrose hepática (Guyot *et al.*, 2005).

De acordo com Roche (2000), a fibrose hepática representa a cicatrização de uma ferida em resposta ao agente agressor, sendo similar à resposta de outros órgãos à injúrias recorrentes, ou seja, independente das causas, os mecanismos gerais de fibrose são similares. Há uma cascata de eventos após a injúria, frequentemente com um componente do stress oxidativo, seguido por mobilização de células inflamatórias, que liberam citocinas, que contribuem diretamente (e indiretamente) para a ativação das células efectoras, como as células estreladas hepáticas (HSC). As HSC quando ativadas liberam citocinas como a proteína quimiotática para monócito-1 (MCP-1) e peptídeos biologicamente ativos que amplificam a resposta (Roche, 2000; Pinzani & Rombouts, 2004). No fígado normal essas células perisinusoidais, também chamadas células de Ito ou lipócitos, correspondem a 5-8% do total de células. Elas são distribuídas através do lóbulo hepático e servem como um sítio principal de estocagem para retinóides (metabólitos da vitamina A), e quando ativadas perdem o conteúdo lipídico, adquirindo um fenótipo miofibroblástico (Guyot *et al.*, 2005). Esse fenótipo é caracterizado por um alto potencial proliferativo e por produzir um excesso de ECM (Schuppan *et al.*, 1999).

No baço a congestão era observada macroscopicamente pela coloração e a fluidez de sangue ao corte do órgão, foi um achado comum e comprovado quando observado ao microscópio óptico. O espessamento da cápsula, assim como, a inflamação capsular e subcapsular foram observados, principalmente, nos animais sintomáticos. Todavia, a hipertrofia e hiperplasia da polpa branca ocorreram em todos os grupos estudados, principalmente nos animais sintomáticos e assintomáticos. Essas alterações encontram-se descritas em trabalhos na literatura como os de Veress *et al.*, (1977) no homem, Tafuri *et al.*,

(1996) para animais naturalmente infectados e Tafuri *et al.* (1996) em animais experimentalmente infectados. Depleção de áreas T dependentes, bainha periarteriolar da polpa branca, no baço de hamsters e cães experimentalmente infectados com *L. donovani* (CORBETT *et al.*, 1992; KEENAN *et al.*, 1994), tem sido amplamente descritos na literatura, sendo que esses animais certamente desenvolvem algum grau de imunodepressão. Nesse trabalho, essa alteração foi observada em dois animais sintomáticos. Todavia, na região de polpa vermelha, grande número de macrófagos parasitados pôde ser observado em animais tanto de perfil sintomático quanto de perfil assintomático. A presença de macrófagos, altamente parasitados no parênquima de órgãos linfóides de animais assintomáticos, é também descrita por outros autores como Abranches *et al.* (1991), Lima *et al.* (2004) e Xavier *et al.*, (2006). Na leishmaniose visceral ocorre o desenvolvimento de uma resposta imune órgão-específico em dois principais órgãos alvos de infecção - o baço e o fígado. Estudos indicam que o baço, considerado local inicial da geração da resposta imune mediada por células, também parece ser o local de persistência do parasito associada com modificações imunopatológicas. Estas incluem esplenomegalia e distúrbios na arquitetura tecidual que parecem contribuir para o estado de imunocompetência do hospedeiro (STANLEY & ENGWERDA, 2007; LIMA *et al.*, 2007).

Evidenciamos em nosso estudo a maior deposição de fibras reticulares no baço dos cães dos grupos de animais sintomáticos e assintomáticos em relação ao grupo de animais controle. Resultados estatisticamente significativos ao compararmos a deposição colagênica entre todos os grupos. No baço dos animais sintomáticos foi onde quantificamos a maior deposição, sendo que nesses animais, as fibras reticulares esplênicas, apresentavam-se mais espessadas, formando uma trama mais compacta. Outro achado relevante no baço foi a espessura de cápsula que variou de acordo com o grupo de animais estudados. Nos animais sintomáticos e assintomáticos essa espessura era bem maior quando comparada com a espessura média da cápsula dos animais controles, resultados estatisticamente significativos. Adicionalmente, houve correlação positiva na deposição de fibras colágenas no

parênquima esplênico, na espessura da cápsula quando comparamos com a carga parasitária neste órgão.

O excesso de acúmulo de MEC que leva a fibrose ocorre quando a formação excede a degradação. Nas inflamações crônicas, consequência comum das infecções parasitárias é um potente promotor de formação de matriz extracelular (ANDRADE et al., 1991). Então, a colagênese intensa observada nos baços dos animais infectados (sintomáticos e assintomáticos) estaria diretamente relacionada ao parasitismo e às alterações histológicas encontradas. Adicionalmente, a esplenomegalia foi mais preponderante nos animais sintomáticos que apresentaram maior carga parasitária. Outro fato que explicaria.

Outro fato que explicaria a intensa congestão e colapso estrutural do parênquima que contribuiria para o aumento de peso e de tamanho esplênico, assim como a deposição de fibras reticulares na leishmaniose visceral canina postulado por Weiss et al., (1986) e Alexandre - Pires et al., (2006) é que a presença de maior número de células reticulares que formam o leito de filtração sinusoidal seria responsável por vários mecanismos como controle da circulação do baço através da contração, alinhamento da expansão das células dendríticas e reticulares promovendo a síntese de colágeno do tipo III (fibras reticulares). Sob condições de parasitismo na leishmaniose visceral, uma importante rede formando uma barreira dessas fibras extracelulares pode ser vista. Esta nova condição formada está provavelmente envolvida no impedimento ou na diminuição do fluxo de elementos sanguíneos através do leito de filtração e conseqüentemente o trânsito dos parasitos pelo baço. Este mecanismo reticular parece ser efetivo na origem da condição de stress pela queda no fluxo de sangue, assim como no mecanismo imunológico esplênico. O colapso da arquitetura sinusoidal pode ser responsável pelo processo congestivo inicial e aumento massivo típico do órgão na leishmaniose visceral.

A expressão de laminina esplênica também foi superior nos animais sintomáticos e assintomáticos em relação aos animais controles, porém não houve diferenças estatísticas de expressão entre os grupos de animais sintomáticos e assintomáticos e sim quando comparamos a expressão desses grupos com o grupo controle. Em relação a expressão de fibronectina no baço

dos animais infectados observou-se um aumento estatisticamente significativo de expressão nos animais dos grupos sintomáticos e assintomáticos. Nesses órgãos podemos inferir que estas fibras adesivas possuem grande participação na resposta desenvolvida contra a doença neste órgão. Em resposta a injúria tecidual quantidades elevadas de fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ) e de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) liberados pelos macrófagos podem induzir à fibrogênese pela excessiva produção de Matriz extracelular (JONES et al., 1992). Houve correlação positiva entre a expressão de laminina e a carga parasitária apresentada pelos baços dos animais naturalmente infectados com *Leishmania*.

Na LVC a linfadenopatia é um achado clínico freqüente (CIARAMELLA et al, 1997; COSTA VAL, 2004; LIMA et al., 2004). Nossos resultados estão de acordo com estes autores, pois a linfadenopatia, especialmente dos linfonodos cervicais, foi o sinal clínico mais prevalente verificado nos cães deste experimento. Lima et al. (2004) relatam que a linfadenopatia, observada em cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, relaciona-se principalmente com a hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos medulares (cordões e seios). Adicionalmente, esses autores observaram que os linfonodos cervicais apresentam mais alterações que os axilares e poplíteos. Segundo Ciaramella et al. (1997) a maior reatividade dos linfonodos cervicais deve-se à sua posição anatômica, uma vez que estes drenam as regiões cutâneas e subcutâneas da cabeça e orelha (COSTA et al., 2008).

Na cápsula o desarranjo estrutural com neo-formação conjuntiva associada a quadros inflamatórios é descrito não só para cães naturalmente infectados como para animais experimentalmente infectados (Tafari et al., 1995). Alterações inflamatórias no seio subcapsular e a hipertrofia e hiperplasia de macrófagos foram às alterações mais freqüentes, assim como os descritos por Lima et al., (2004).

Os pesos relativos dos linfonodos cervicais nos grupos sintomáticos e assintomáticos foram maiores, porém não foram estatisticamente significativos. Somente quando comparamos os linfonodos cervicais nos animais infectados em relação aos animais controles observamos esta diferença. As alterações histopatológicas como linfadenite capsular, congestão e depósito de

hemossiderina observadas foram maiores nos animais sintomáticos quando comparado aos assintomáticos. Todavia, não houve diferenças significativas entre as cargas parasitárias entre os grupos de animais sintomáticos e assintomáticos.

O parasitismo correlacionou-se positivamente com a linfadenite capsular e com o quadro de hipertrofia e hiperplasia dos nódulos linfóides, sugerindo que a reatividade das células dos linfonodos estejam associadas à maior estimulação antigênica decorrente da carga parasitária. Os centros germinativos são histologicamente definidos como agregados de células blásticas constituindo áreas de células B, no tecido linfóide, após estimulação antigênica. Eles estão associados com o desenvolvimento de células B de memória e células plasmáticas, especialmente secundário a IgG e IgA (KRAAL et al., 1982). Sabe-se que na LVC a resposta imune humoral desenvolvida é bastante intensa, traduzindo-se na presença de elevados títulos de anticorpos anti-*Leishmania* (ALVAR, 2004).

Nos linfonodos cervicais avaliados, a deposição de fibras colágenas foi maior nos animais sintomáticos, porém não houve diferenças estatísticas quando comparamos com a deposição colagênica nos animais assintomáticos. Essa diferença só foi constatada quando comparamos os linfonodos cervicais dos animais sintomáticos com os dos animais controles. Outro achado interessante foi que na região medular dos linfonodos cervicais dos animais sintomáticos e assintomáticos a deposição de colágeno foi mais escassa, devido ao grande número de nódulos linfóides da região. Quando avaliávamos a região cortical a deposição de colágeno aumentava substancialmente nos linfonodos desses animais. A deposição era observada tanto nos cordões, quanto nos seios medulares. Esses achados, somados com as alterações aqui descritas devem contribuir para o aumento de tamanho e volume dos linfonodos cervicais, quadro clínico o qual poderíamos denominar de linfadenite reacional em animais naturalmente infectados com *L.chagasi*. Encontramos também, correlação positiva entre a deposição de fibras colágenas nos linfonodos e a carga parasitária deste órgão.

Evidenciamos um aumento da expressão da laminina nos linfonodos dos animais sintomáticos e assintomáticos, entretanto estes resultados não foram considerados estatisticamente significativos. Quando comparamos essa

expressão com as apresentadas pelos animais controles, temos então resultados significativos. Houve correlação positiva entre a expressão de laminina e a carga parasitária dos linfonodos cervicais.

Abreu-Silva et al. (2004) demonstraram em pesquisas com infecção experimental em camundongos com *L. amazonensis* que não houve alteração na expressão da laminina nos linfonodos poplíteos de camundongos após noventa dias de infecção. Os resultados da expressão da fibronectina nos linfonodos cervicais foram maiores nos animais dos grupos sintomáticos e assintomáticos quando comparamos ao grupo controle. Estes dados demonstram que componentes da matriz, como fibronectina e laminina estão envolvidos diretamente na patogênese da leishmaniose visceral.

A maior expressão de CR3 (CD11CD18) em cães infectados com *L. chagasi* foi demonstrada qualitativamente no baço de animais naturalmente e experimentalmente infectados por Tafuri et al. (2006). Considerando que os animais sintomáticos têm expressão aumentada de CR3 no baço e nos linfonodos cervicais, e existe correlação positiva com o parasitismo tecidual desses órgãos (dados não mostrados), podemos inferir que macrófagos CR3 positivos seriam mais uma fonte de perpetuação da infecção causada por *L. chagasi*. Estes órgãos podem estar relacionados com a contínua produção de fatores de crescimento envolvidos na fibrogênese apresentada pelos órgãos estudados (JONES et al., 1992; LIMA et al., 2007). Em animais naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* há maior expressão de receptores do complemento do tipo três (CR3) no baço, fígado e linfonodos, expressos na superfície de macrófagos teciduais, podendo este achado estar relacionado também à fibrogênese observada nestes órgãos na LVC.



## 6 – CONCLUSÕES

---

- Nossos resultados permitiram concluir que os animais naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* apresentam aumento da deposição de matriz extracelular do baço, fígado e linfonodos em relação ao grupo controle, não infectados.
- Tanto o parasitismo tecidual, quanto o caráter inflamatório encontrado nos tecidos estudados correlacionam-se com as alterações da matriz extracelular nos tecidos dos animais infectados.
- Existe correlação positiva entre o parasitismo tecidual do fígado, baço e linfonodos cervicais de animais naturalmente infectados e a deposição de colágeno, laminina (LN) e fibronectina (FN) nestes órgãos.
- Os animais naturalmente infectados do grupo sintomáticos apresentaram maior grau de alterações de matriz intersticial.
- Animais naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* apresentam maior expressão de receptores do complemento do tipo três (CR3) no baço, fígado e linfonodos podendo este achado estar relacionado também à fibrogênese observada nestes órgãos na LVC.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SANTOS GOMES, G.M; JANZ, G. Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol*, v.77, p.557-561, 1991.

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*, 128: 385–390, 2004.

ANDRADE ZA, ANDRADE SG, 1966. [Some new aspects of the kala-azar pathology. (Morphologic study of 13 autopsy cases)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.8: 259-66. 1966.

ANDRADE, Z.A. Extracellular matrix degradation in parasitic diseases. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* v.27, p.2273-2281, 1994.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int.J.Parasitol.*, v.30, n.12-13, 11/2000, p.1269-1281. 2000.

ALENCAR, J.E. Calazar Canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 342 pg, 1959.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell. Sci.*, v.112, p.2993-3002, 1999.

ALEXANDRE-PIRES, G.; PAIS, D.; CORREIA, M.; ESPERANÇA PINA, J.A. Leishmaniosis-A report about the microvascular and cellular architecture of the spleen in *Canis familiaris*. *Microscopy Reseach an Technique*. V.69, p.227-235, 2006.

ALVAR, J.; CANAVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v.57, p.2-64, 2004.

ANDERSON, D.C.; BUCKNER, R.G.; GLENN, B.L.; MAC VEAN, D.W. Endemic canine leishmaniasis. *Vet. Pathol.*, v.17, p.94-96, 1980.

BANDYOPADHYAY, K.; SUDIPAN, K.; GHOSH, A. & PIJUSK, K. High affinity binding between laminin and laminin binding protein of *Leishmania* is stimulated by zinc and may involve laminin zinc-binding like sequences. *European Journal of Biochemistry*, 269: 1622–1629, 2002.

BEACHEY, EH. Bacterial adherence adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, 143: 325-345, 1981.

BHOGAL, R. K. E C. A. BONA. B cells: no longer bystanders in liver fibrosis. *J Clin Invest*, v.115, n.11, Nov, p.2962-5. 2005.

BLACKWELL, J.M.; HOWARD, J.G.; LIEW, F.Y.; HOLE, C. Mapping of the gene controlling susceptibility to cutaneous leishmaniasis. *Mouse New Letter*, v.70, p. 86-89, 1984.

BOGLIOLO, L. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência a fibrose hepática leishmaniótica. *O Hospital*, v. 3, p.101. 1956.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE – [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br) – acesso em 28/08/06.

BRENER, Z. *Calazar canino em Minas Gerais*. 1957. 90 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1957.

BRYCESON, A.D.M. Leishmaniasis. In COOK, G.C. (Ed.). *Manson's Tropical Diseases*. London: WB Saunders Company, p.1213-1245, 1996.

CALIARI, M. V. *Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes*. Belo Horizonte: Editora da UFMG, 148 p. 1997.

CHAGAS, E.; CUNHA, A.M.; CASTRO, G.O; FERREIRA, L.C. & ROMANA, C. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, v.32, p.321-385, 1937.

CHAGAS, E.; CUNHA, AM.; FERREIRA, L.C.; DEANE, L.M.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F.N.; PAUMGARTEN, M.J.V. & SÁ, B. Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, v.33, p.89-229, 1938.

CHANG, K.P. *Leishmania donovani*: Promastigote -macrophage surface interactions in vitro. *Exp. Parasitol.*, v.48, p.175-189, 1979.

CIARAMELLA, P; OLIVA, G; DE LUNA, R; GRADONI, L; AMBROSIO, R; CORTESE, L; SCALONE, A & PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *L. infantum*. *Vet. Rec.*, v.141, p.539-543, 1997.

CORBETT, C.E.P.; DUARTE, M.I.S. ; BUSTAMANTE, S.E.; Regression of diffuse intralobular liver fibrosis associated with visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.v.49, p.616-624, 1993.

COSTA VAL, A.P. Tratamento da leishmaniose visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas (Doutorado). Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2004, 125p.

COSTA MM, LIMA WG, FIGUEIREDO MM, MICHALICK MS, TAFURI WL. 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. *Vet Pathol. V. 45*: 613-6, 2008.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional de Robbins, 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro xxii+ 1251p, 2000.

CUNHA, AM. & CHAGAS, E. Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.32*, p.329-337, 1937.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, v.72, p.132-141, 2002.

De ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M Leishmanial infection: analysis of its first steps. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, V.98*, P.861-870, 2003.

DA COSTA-VAL, A. P., R. R. CAVALCANTI, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*, v.174, n.3, Nov, p.636-43. 2007.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*, v.47, p.75-87, 1955.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.4, p.149-212, 1962.

DEVINE, D.V.; BRADLEY, A.LJ. The complement system in liposome clearance: Can complement deposition be inhibited? *Adv. Drug Del. Rev.*, v.32, p.19-29, 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v.27, p.305-318, 2004.

DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Notes sur la leishmaniose viscerale canine. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.28, p.426-431, 1935.

DUARTE, M.I.S.; LAURENTI, M.D.; BRANDAO NUNES, V.L.; REGO JUNIOR, A.F.; OSHIRO, E.T.; CORBETT, C.E. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v.28, p.431-436, 1986.

ENGEL J, ODERMATT E, ENGEL A, MADRI JÁ, FURTHWAY H, ROHDE H, TIMPL R. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of extracellular matrix. *Journal of Molecular Biology*, v. 150, p. 97-120, 1981.

FAURÉ-BRAC, G. La leishmaniose canine. *Rev. Path. Comp. Hyg. Gén.*, v.33, p.648-649, 1933.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: Proceedings of the XVI World Small Veterinary Association Congress, Vienna, p.52-54, 1991.

FERRER, L. Canine leishmaniasis. In: KIRK, R.W. (ed). *Current veterinary Therapy*, Philadelphia. V.11, p. 262-266, 1992.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: Moving towards a solution, 2, 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sumene, (s. ed.),P. 21-24, 2002.

FONT, A.; CLOSA, J. Ultrasonographic localization of a caudal vena thrombus in a dog with leishmaniasis. *Vet. Radiol. Ultrasound.*, v.38, p.394-396, 1997.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. (Doutorado), Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 1993. 202p.

GILLESPIE, R.D.; MBOW, M.L.; TITUS, R.G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.*, v.22, p.319-331, 2000.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Relation between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Path.*, v.135, p.100-107, 2006.

GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L.; MELO, M.N.; RASO, P.; TAFURI, W.L. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.45, p.153-158, 2003.

GONÇALVES, R.; VIEIRA, E.R.; MELO, M.N.; GOLLOB, K.J.; MOSSER, D.M.; TAFURI, W.L. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. infantum chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC. Infect. Dis.*, v.24, p.39, 2005.

GOSH, A; BANDYOPADHYAY, K.; KOLE, L.; DAS, P. K. Isolation of lamim-binding protein from the protozoan parasite *Leishmania donovani* that may mediate cell adesion. *Biochem. J.*, 337: 551-558, 1999.

GONZALEZ, J. L., E. ROLLAN, et al. Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. *Histol Histopathol*, v.3, n.4, Oct, p.323-9. 1988.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S.L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M.K. & BRYCESON, A.D.M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.*, v.2, p.494-501, 2002.

GUI, S. Y., W. WEI, et al. Effects and mechanisms of crude astragalosides fraction on liver fibrosis in rats. *J Ethnopharmacol*, v.103, n.2, Jan 16, p.154-159. 2005.

GUYOT, C., S. LEPREUX, et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: The (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol*, v.38, n.2, Feb, p.135-51. 2005.

HANDMAN E, BULLEN DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 332-334, 2002.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v.354, n.9185, 10/2/1999, p.1191-1199. 1999.

IVERSSON, L.B.; CAMARGO, M.E.; VILLANOVA, A.; REISHMANN, M.I.; ANDRADE, E.A.; TOLEZANO, J.E. Serological survey for research on visceral leishmaniasis in an urban dog population of the municipality of São Paulo, Brazil (1979-1982). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.25, p.310-317, 1983.

JUNGERY, M. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, p. 591-597, 1985.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H.K.; JOHNSON, A. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.*, v.2, p.74-79, 1984.

JONES, C.L.; BUCH, S.; POST, M.; McCULLOCH, L.; LIU, E. Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminucleoside nephrosis in rats. *Journal of Pathology*. v .166, p.351-358, 1992.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin. Hematol.*, v.7, p.26-31, 2000.

KILLLLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v.65, p.37-42, 1979.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*,v.65, p.37-42, 1990.

KRAAL, G.; WEISSMAN, I.L.; BUTCHER, E.C. Germinal centre B cells: antigen specificity and changes in heavy chain class expression. *Nature*, v.298, p.377-379, 1982.

KULKARNI, M.M.; JONES, E.A.; MCMASTER, W.R.; MCGWIRE. B.S. Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. *Infect Immun*, v. 76: 1738-47. 2008.

LAINSON R, RYAN L, SHAW JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.82, p. 421-424, 1987.

LAVERAN, A.; MESNIL, F. Sur um protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. & Mesn.). Parasite d' une fièvrew de l'Ind. *Com. R. Hébr. Séanc. Acad. Sci.*, v.137, p.957-961, 1903.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymphnodes. *Acta. Trop.*, v.92, p.43-53, 2004.

LIMA, W.G.; OLIVEIRA, P.S.; CALIARI, M.V.; GONÇALVES, R.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.117, p.129-136, 2007.

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.

MARCUSSEN, N.; VETNER, M.; KRISTENSEN, H.M. Interstitial nephritis and glomerulonephritis in visceral leishmaniasis in a dog. A case report, *APMIS*, v.97, p.1137-1140, 1989.

MARGONARI, C.; FREITAS, C.R.; RIBEIRO, R.C.; MOURA, A.C.M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A.H.; PESSANHA, J.P.; DIAS, E.S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, V.101, P.31-38, 2006.

MARKWELL, M.A.K.; PAULSON, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, n. 77, p. 5693-5697, 1980.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A; AMENTA, P.S. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995: 1401-1410.

MARTIN, G.R. & KLEINMAN, H.K. The extracellular matrix components in development and disease. *Semin. Liver Dis.* V.5, p.147-156, 1985.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A; RANGEL JR, F.B. & TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutic and Epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.80, p.349-357, 1985.

MARZOCHI, M. C. A. e K. B. F. Marzochi. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - emerging zoonosis and possibilities for their control. *Cad.Saude Publica*, v.10, n.2, 1994, p.359-375. 1994.

MARGONARI, C.; FREITAS, C.R.; RIBEIRO, R.C.; MOURA, A.C.M.; TIMBÓ, M.; GRIPP, A.H.; PESSANHA, J.P.; DIAS, E.S. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.101, P.31-38, 2006.

MELO F, AMARAL M, OLIVEIRA P, LIMA W, ANDRADE M, MICHALICK M, RASO P, TAFURI W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. *Am J Trop Med Hyg.* v. 79: 198-204, 2008.

MICHALSKY, E. M., M. F. ROCHA, *et al.* Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to Lutzomyia longipalpis phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol*, v.147, n.1-2, Jun 20, p.67-76. 2007.



MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J. & ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med., Hyg.* 88: 491-493, 1984.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International*, v. 20, p. 15-27, 1996.

MOSHER, D.F. Physiology of fibronectin, *Annual Review of Medicine*, v. 35, p. 561-575, 1984.

MOSSER, D.M.; VLASSARA, H.; EDELSON, P.J.; CERAMI, A. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endoproteins. *Journal of Experimental Medical*, v. 165, p. 140-145, 1987.

MOSSER, D.M.; ROSENTHAL, L.A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin. Cell Biol.*, v.4, p.315-322, 1993.

MOURA, Eliane Perlatto ; RIBEIRO, R. R. ; SAMPAIO, W. M. ; LIMA, W. G. ; ALVES, C. F. ; MELO, F. A. ; MELO, M. N. ; TAFURI, W. L. ; TAFURI, W. L. ; MICHALICK, M. S. M. Histopathological and parasitological analysis of skin tissues biopsies from two distinct anatomical areas of the ears of dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 1, p. 10-15-2008, 2008.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*, v.82, n.5, Oct, p.249-67. 2001.

NATTAN-LARRIER, L. Les cirrhoses hépatiques dues au Kala-azar. *Bull de l' Acad de Médecine*, v.89, p.402-408. 1918.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine canine du Kala-azar. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.1. p.299-301,, 1908)

NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M.A.; SERRANO, E.F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.*, v.45, p.33-47, 1992.

ODENTHAL, M.; NEUBAUER, K.; MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.H. Localization and mRNA steady-state level of cellular fibronectin in rat liver undergoing a CCl<sub>4</sub> – induced acute damage or fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1993;1181: 266-272.

OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.18, p.293-305, 2005.

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

PATARROYO, M.; PRIETO, J.; RINCON, J.; TIMONEN, T.; LUNDBERG, C.; LINDBOM, L.; ASJO, B.; GAHMBERG, C.G. Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology. *Immunol Rev.*, v.114, p.67-108, 1990.

PALATNIK, M. e C. C. Lavor. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. *An Acad Bras Cienc*, v.76, n.3, p.583-593. 2004.

PINZANI, M. E K. ROMBOUITS. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis*, v.36, n.4, Apr, p.231-42. 2004.

PINHEIRO, N. F., JR.; HERMIDA, M. D.; MACEDO, M. P.; MENGEL, J.; BAFICA, A.; DOS-SANTOS, W. L. Leishmania infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun*, v. 74, 3912-21. 2006

RAMOS, O.F.; KAI, C.; YEFENOF, E.; KLEIN, E. The elevated natural killer sensitivity of targets carrying surface-attached C3 fragments require the availability of the iC3b receptor (CR3) on the effectors. *J. Immunol.*, v.140, p. 1293-1243, 1988.

RAY R, BHORIA U, VARMA N, BAMBERY P, DASH S. Gelatinous transformation of bone marrow. *J Assoc Physicians India*. V.40: 277-8. 1992.

REIS, A.B. *Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi, portadores de diferentes formas clínicas da infecção*. 2001. 180f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

RHOADS, M. L.; FETTERER, R.H. Extracellular matrix: a tool for defining the extracorporeal function of parasite protease. *Parasitology Today*, 13: 119-122, 1997.

RIBEIRO, J.M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann. Vet. Entomol.*, v.32, p.463-478, 1987.

RIZVI, F.S.; OUASSI, M.A.; MARTY, B.; SANTORO, F.; CAPRON, A. The major surface protein of Leishmania promastigotes is a fibronectin-like molecule. *European Journal of Immunology*, v. 18, p. 473-476, 1988.

ROCKEY, D. C. Hepatic fibrogenesis and hepatitis C. *Semin Gastrointest Dis*, v.11, n.2, Apr, p.69-83. 2000.

ROGERS, L. A peculiar intralobular cirrhosis of the liver produced by the protozoal parasite of Kala-Azar. *Annals Tropical Medicine and Parasitology*, v.2, p.147-152. 1908.

ROSS, R. (1) Note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies. *Brit. Med. J.*, v.2, p.1261-1401, 1903.

ROTHLEIN, R.; SPRINGER, T.A. Complement receptor type three-dependent degradation of opsonized erythrocytes by mouse macrophages. *J. Immunol.*, v. 135, p.2668-2672, 1985.

RUSSEL, D.G.; TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol. Today*, v.10, p.328-332, 1989.

RUSSEL, D.G.; WRIGHT, S.D. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania promastigotes*. *J. Exp. Med.*, v.168, p.279-292, 1988.

SAMPAIO, W.M.; MOURA, E.P.; ARRUDA, F.C.S.; RIBEIRO, R.R.; CÍNTIA, F.A.; MELO, F.A.; FERNANDES, A.P.S.M.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocytes-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *BMC Vet. Res.*, v.3, p.1-9, 2007.

SANTOS, W.L.C., BADARÓ, J.D.R. AND de-FREITAS, L.A.R. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.*, v.92, p.89-94, 2004.

SANCHEZ, M. A., N. L. DIAZ, et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, v.70, n.6, Jun, p.618-24. 2004.

SANT'ANA, J.A.P.; LIMA, W.G.; OLIVEIRA, M.R.; SIMÕES, L.A.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, Wg. L. Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2007.

SANTANA, C. C., J. VASSALLO, et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol*, Jul 28. 2007.

SCHLEIN Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today.*, v.9 , p. 255-258, 1993.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 577-579, 2006.

SHI, M. N., W. D. ZHENG, *et al.* Effect of IL-10 on the expression of HSC growth factors in hepatic fibrosis rat. *World J Gastroenterol*, v.11, n.31, Aug 21, p.4788-93. 2005.

SCHUPPAN, D., J. J. CHO, *et al.* Interplay of matrix and myofibroblasts during hepatic fibrogenesis. *Curr Top Pathol*, v.93, p.205-18. 1999.

SCHUPPAN, D., A. KREBS, *et al.* Hepatitis C and liver fibrosis. *Cell Death Differ*, v.10 Suppl 1, Jan, p.S59-67. 2003.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.P. & BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, p.285-291, 2001.

SLAPPENDEL, R.J.; GRENE, C.E. Leishmaniasis. In: *Greene C.E. (Ed). Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: WB Saunders Co. p.769-777, 1990.*

SLAPPENDEL,R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in Netherlands. *Veterinary Quartely*, v.10., p.1-16, 1988.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.560-562, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON; H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol.*, v. 130, p.7-12, 2004.

SUNDAR, S & RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.15, p.593-598, 2002.

SPRINGER ,T.A. Leucocyte adhesion to cells. *Scand J Immunol.*, v.32, p.211-216, 1990.

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol. Cell. Biol.*, v.85, p.138-147, 2007.

SWITALSKI, L.M.; PATTI, J.M.; BUTCHER, W.; GRISTINA, A.G.; SPEZIALE, P.; HOOK, M. A collagen receptor in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Molecular Microbiology*, v.7, p. 99-107, 1993.

TAFURI, W.L., TAFURI, W.L., BARBOSA, A.J.A., MICHALICK MS, GENARO O, FRANCA-SILVA JC, MAYRINK W, NASCIMENTO E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.38, p.81-89, 1996.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.3, p.203-212, 2001.

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

TALAMAS-ROHANA, P.; WRIGHT, S.D.; LENNARTZ M.R.; RUSSEL, D.G. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leucocyte integrins. *J. Immunol.*, v.144, p.4817-4824, 1990.

TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert. Rev. Diagn.*, v.3, p.657-667, 2003.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v.52, n.3, 3/1995, p.287-292. 1995.

TOMÉ, G.S. Contribuição ao estudo da anatomia patológica da leishmaniose visceral canina espontânea, com especial referência ao foco do Ceará. In: CONG. BRAS. HYG. Fortaleza. 1956.p.13.

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

TURK, J.L. & BRYCESON, A.D.M. Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv. Immunol.*, v.13, p.209-266, 1971.

VALKOVA, M. Hepatic fibrogenesis. *Bratisl Lek Listy*, v.103, n.2, p.76-85. 2002.

VON DER MARK, H; VON DER MARK, K; GAY, S. Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. *Developmental Biology*, v. 48, p. 237-249, 1976.

XAVIER, S.C.; DE ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet. Res.*, v.8, p. 2-17, 2006.

WESTERLUND, B.; KORHONEN, T.K. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol. Microbiol.*, v.9, p.687-694, 1993.

WEISS, L.; GEDULDING, U.; WEIDANZ, W. Mechanism of the splenic control of murine malaria: reticular cell activation and the development of a blood-spleen barrier. *Am. J. Anat.*, v. 176, p. 251-285, 1986

WORLD HEALTH ORGANIZATION  
(WHO). <<http://www.who.int/leishmaniasis/en>>2007

WYLER, D. J. Fibronectin in parasitic diseases. *Review of Infectious Disease* 4: S391–S399, 1987.

WYLER, D. J., SYPEC, J. P. & MCDONALD, J. A. In vitro parasite–monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infections and Immunity*, v. 49, p. 305–311, 1985.

YAMADA, K.M. & KEMLER, R. Cell to cell contact and extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 14: 527–530, 2002.

## ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 102/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo das alterações da matriz extracelular, do fígado, baço, medula óssea, linfonodos e da pele de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi**", que tem como responsável **Wagner Luiz Tafuri**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **31/ 05/2006**.

Este certificado expira-se em **31/ 05 / 2011**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 102/2006**, related to the project entitled "**Study of the extracelular matrix alterations of the liver, spleen, bony marrow, lymph nodes and skin of dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi**", under the supervision of **Wagner Luiz Tafuri**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 31, 2006**.

This certificate expires in **May 31, 2011**.

Belo Horizonte, 31 de Maio de 2006.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Presidente do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027  
[www.ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)