

**FERNELY AUGUSTO PLAZAS HERNANDEZ**

**EXPRESSÃO CUTÂNEA DAS  $\beta$ -DEFENSINAS (cBD102 E cBD103) EM CÃES  
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P723e  
2012

Plazas Hernandez, Fernely Augusto, 1984-  
Expressão cutânea das  $\beta$ -defensinas (cBD102 E cBD103)  
em cães acometidos por leishmaniose visceral / Fernely  
Augusto Plazas Hernandez. – Viçosa, MG, 2012.  
xvi, 50f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 45-49.

1. Cão - Doenças. 2. Peptídeos. 3. Leishmania. 4. Zoonoses.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08965

**FERNELY AUGUSTO PLAZAS HERNANDEZ**

**EXPRESSÃO CUTÂNEA DAS  $\beta$ -DEFENSINAS (cBD102 E cBD103) EM CÃES  
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de novembro de 2012.

---

Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho

---

Marlene Isabel Vargas Vilorio

---

Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo

---

Lissandro Gonçalves Conceição  
(Orientador)

*A **Deus** graças pela vida, e a sua presença em cada segundo.*

*A minha rainha, tesouro, vida, mestra e exemplo, minha mãe, minha “**Mami Chancha**”.*

*A minha avó, “**Mami Yoya**” pelo apoio, amor, conselhos em cada respiração da minha vida.*

*A meu **Pai Ismael** pela alegria e energia sempre transmitida e seus diretos e sábios ensinamentos.*

***Dedico este trabalho***

*As dificuldades sobrepassadas no presente são as decorações dos triunfos do futuro.*

***Fernely Plazas Hernandez***

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao departamento de Veterinária pela oportunidade, em especial ao professor Lissandro Goncalves Conceição, meu mentor, mestre e amigo pela paciência e apoio no decorrer do meu mestrado.

Ao professor Joaquin Patarroyo Salcedo e a professora Marlene Isabel Vargas pelo apoio incondicional, não só colocando a minha disposição as dependências do BIOAGRO/UFV, mas também o grande apoio moral. Obrigado por me fazer sentir em casa em alguns momentos da minha estadia no Brasil.

À professora Renné Laufer Amorin em Botucatu, por me guiar, por contribuir e transformar nosso trabalho. Obrigado pela amabilidade e os aportes oportunos.

Ao Fabrício, Rafael Torres e Raquel. Ao pessoal do departamento de Patologia da UNESP/Botucatu pelo tempo dedicado na conclusão deste trabalho.

Meus grandes amigos em Botucatu, Paulo Ricardo meu grande amigo Mauricio Montoya e Francisco Pedraza meus amigos doutores, obrigado pela acolhida na cidade, por me fazer sentir em casa neste tempo, pela confiança e os bons momentos.

João, amigo, obrigado pela boa meditação em Botucatu. Sua paciência e prudência me fizeram uma pessoa melhor.

Meus amigos e irmãos de Viçosa, Paulo Roberto Silveira “Robertinho” obrigado por me adotar, você não é meu amigo, é um verdadeiro irmão que deixo. Seu carinho, fina energia e respeito pelo próximo, é uma lição de vida, obrigado também por me dar o privilégio de conhecer sua maravilhosa família, minha família Brasileira favorita (José Roberto Da Silva, Maria Das Graças Silveira Silva, Maria Carolina Silveira Silva) obrigado por me adotar, vocês são os melhores. Meu neurótico, mais inteligente e reto amigo Mateus Duarte Brito, foi um prazer aprender com você, é um prazer ter conhecido você. Meu amigo cantor, meu irmão artista, você também está nas minhas boas lembranças Vítor Matoso. Jonas obrigado pelo silencioso respeito e amizade.

Espero você também aqui na Colômbia. Douglas que a sua imaginação o leve além dos seus sonhos, obrigado pela amizade e os bons momentos.

Meu grande e incondicional amigo Gabriel Andrés Tafur, você é um perseverante e vai conseguir muito na vida, obrigado pelo apoio sempre, sempre amizade pura.

Meu primeiro e especial amigo Erick Ferreira, você sempre será um grande exemplo a seguir, seus conselhos, histórias e atenções, estão no meu coração amigo, obrigado pela amizade.

Vinicius Zacarias Mirando, obrigado pela paciência, e apoio, por fazer-me lembrar que na vida existem pessoas como você cheias de alegria, carinho, educação e bons princípios religiosos, obrigado por me fazer uma pessoa melhor.

Minha linda e especial amiga Rafaella Peixoto, sua decência, respeito e hospitalidade fizeram da minha estadia uma experiência muito valiosa, graças por me guiar, pela paciência e bons conselhos de vida.

Aos grandes e maravilhosos músicos Brasileiros Cazusa e Raul Seixas, vocês mediante a música encheram de emoções, sonhos, alegrias e energia minha experiência no Brasil. Obrigado por contribuir a sanar o meu espírito, melhorar minha atitude acadêmica e me ensinar mais a fundo a cultura dos meus irmãos Brasileiros.

A Rosa e Margarete, gente linda, gente boa de mais... Nunca vou esquecer sua atitude sempre cheia de felicidade que contagiou e animou muito a minha vida.

A uma nova oportunidade na minha vida, um novo sucesso e novo triunfo, chamado Carmen Elena Guevara Saez. Obrigado por construir e ser parte de um grande pilar da minha vida.

A minha amiga Fernanda Fernandes, pela guia e oportunidades que colocou no meu caminho.

Ao Omar Aristizabal e seu amor Jéssica, obrigada pela amizade e acolhida sempre calorosa e cordial.

Ao Marcos e Sandra pelos bons momentos que fazem inesquecível esta amizade.

A Rosa e Rose, duas garotas que colocarem em ordem não só minha habitação, mas também minha vida, com suas atenções.

Ao meu inesquecível, amado e lembrado sempre, meu Vodka, minha vidinha, meu companheiro, obrigado pela companhia nos bons e maus momentos, meu coração tem um lugar privilegiado para você, obrigado por me lembrar de que as grandes criações de Deus e os grandes propósitos podem estar em diferentes formas de vida e em pequenos corações como o seu, obrigado por tudo meu especial porquinho.

A Blanca Guzmán, por me brindar a oportunidade de estudar num país maravilhoso, o Brasil.

Aos cães da UFV, obrigado por sempre manter a direção da minha carreira, da minha vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Peptídeos antimicrobianos	3
2.2 Defensinas e $\beta$ -defensinas	4
2.3 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)	5
2.4 Interação da LVC com o sistema imunológico	6
2.5 Padrão dermatológico: dermatite descamativa (dd) e dermatite ulcerativa (du)	7
3. JUSTIFICATIVA	8
4. OBJETIVOS	9
4.1 Objetivo geral	9
4.2 Objetivos específicos	9
5. MATERIAL E MÉTODOS	10
5.1 Amostras de tecidos incluídos em parafina (Blocos)	10
5.2 Preparo da lâmina histológica	10
5.3 Confirmação de casos positivos para leishmaniose visceral canina	11
5.4 Os homólogos das $\beta$ -defensinas cBD102 e cBD103	12
5.5 Técnica da imuno-istoquímica para avaliação de cBD102 e cBD103	13
5.6 Escores na avaliação imuno-istoquímica na expressão de extensão e intensidade	14
5.7 Digitalização das imagens	14

<b>6.</b>	<b>ANALISE ESTATÍSTICA</b>	15
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	17
	7.1 Expressão da extensão e intensidade de $\beta$ -defensinas (cBD-102 e cBD-103) na epiderme	17
	7.2 Expressão da extensão e intensidade de $\beta$ -defensinas (cBD-102 e cBD-103) na derme	20
<b>8.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	24
<b>9.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	27
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	28
	<b>ABREVIATURAS</b>	33

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Comprovação da leishmaniose visceral canina pela técnica de imunistoquímica (IPI): Inúmeras formas amastigotas marcadas pelo anticorpo primário. (X 400) 12
- Figura 2 Nota-se a baixa expressão de extensão representada com a cor marrom da  $\beta$ -defensina cBD102 comparada com a cBD103 na epiderme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DD (X 200). 18
- Figura 3 Nota-se a maior expressão de extensão da  $\beta$ -defensina cBD103 comparada com a cBD102 representada com a cor marrom na epiderme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DU (X 200). 18
- Figura 4 Note-se a expressão de intensidade da  $\beta$ -defensina cBD102 corada de marrom na epiderme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DD (X 400). 19
- Figura 5 Note-se a expressão de intensidade sem diferença significativa da  $\beta$ -defensina cBD103 frente a cBD102 corada de marrom na epiderme de pacientes acometidos por LVC dentro do grupo DU (X 400). 19
- Figura 6 Note-se a expressão de extensão da  $\beta$ -defensina cBD102 na derme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DD (X 200). 21
- Figura 7 Note-se a expressão de extensão mais marcada da  $\beta$ -defensina cBD103 frente na cBD102, corada de marrom na derme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DD (X 200). 21

- Figura 8 Note-se a expressão de intensidade da  $\beta$ -defensina cBD102 coradas de marrom na derme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DU (X 400). 22
- Figura 9 Note-se em um grau mais forte a expressão de intensidade da  $\beta$ -defensina cBD103 frente a cBD102, na derme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DU (X 400). 22
- Figura 10 Correlação da expressão de extensão da cBD102 e cBD103 com a carga parasitária de pacientes acometidos pela LVC com dermatite descamativa 23
- Figura 11 Correlação da expressão de extensão da cBD102 e cBD103 entre a carga parasitária de pacientes acometidos pela LVC com dermatites ulcerativa 23

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Coeficiente de Concordância Spearman entre os avaliadores quando utilizada  $\beta$ -2 e  $\beta$  -3 dentro das variáveis extensão e intensidade para os grupos positivos com dermatite descamativa, ulcerativa e grupo controle na epiderme e derme. 16
- Tabela 2-** Extensão e intensidade da expressão de  $\beta$ -defensinas cBD-102 e cBD-103 na epiderme de animais com dermatite descamativa (DD) e dermatite ulcerativa (DU) decorrentes de leishmaniose visceral canina 17
- Tabela 3-** Extensão e intensidade da expressão de  $\beta$ -defensinas cBD102 e cBD103 na derme de animais com dermatites descamativa (DD) e dermatites ulcerativa (DU) decorrentes de leishmaniose visceral canina 20

## RESUMO

PLAZAS HERNANDEZ, Fernely Augusto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2012. **Expressão cutânea das  $\beta$ -defensinas (cBD102 e cBD103) em cães acometidos por leishmaniose visceral.** Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição. Coorientador: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo.

Em resposta a uma infecção as defensinas são produzidas em questão de minutos ou até 2 horas por células sanguíneas como neutrófilos, para auxiliar a lise de patógenos e estimular a quimiotaxia, alcançando níveis máximos no organismo em 24 horas. Também estes peptídeos podem ser produzidos sem estímulo algum pelas células epiteliais do sistema tegumentário. Com base no exposto anteriormente, o objetivo deste trabalho foi estudar a expressão de  $\beta$ -defensinas (cBD102 e cBD103) de pele de cães diagnosticados com leishmaniose visceral canina (LVC). Para tal, foram selecionados 43 amostras de pele entre cães acometidos por LVC e sadios incluídas em blocos de parafina, distribuídos em 3 grupos: I com dermatite descamativa (DD) por 16 blocos, II dermatite ulcerativa (DU) 21 blocos e o grupo controle (6 blocos de cães sem problemas dermatológicos). Foi empregada a técnica de imunoperoxidase indireta (IPI) para a confirmação do diagnóstico de LVC e identificação de  $\beta$ -defensinas, usando os anticorpos primários humanos (hBD102 e hBD103, SIGMA<sup>®</sup>). O delineamento foi inteiramente casualizado, adotando 0,05% de probabilidade para o erro Tipo I. Nota-se que houve diferença ( $p=0,003$ ) na intensidade da imunomarcção entre os grupos, observando-se maior intensidade de marcação da cBD102 e cBD103 no grupo controle quando comparados com os grupos DD e DU. Na derme houve diferença ( $p=0,001$ ) entre a expressão das duas  $\beta$ -defensinas estudadas, sendo a expressão de cBD103 superior a de cBD102. O presente estudo é o primeiro referente à interação imunológica da expressão de extensão e intensidade entre a  $\beta$ -defensina cBD102 e cBD103 e a leishmaniose visceral canina, nos padrões dermatológicos DD e DU, avaliados pela técnica de imunoistoquímica.

## ABSTRACT

PLAZAS HERNANDEZ, Fernely Augusto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2012. **Cutaneous expression of  $\beta$ -defensins (cBD102 and cBD103) in dogs with canine visceral leishmaniasis.** Adviser: Lissandro Gonçalves Conceição. Co-adviser: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo.

In response to an infection, blood cells such as neutrophils produce defensins within minutes to two hours to aid pathogens lysis and stimulate chemotaxis, reaching peak levels in the body in 24 hours. These peptides can also be produced without any stimulus by epithelial cells of the integumentary system. The aim of this work was to study the expression of  $\beta$ -defensins (cBD102 and cBD103) of canine skin diagnosed with canine visceral leishmaniasis (CVL). There were selected 43 skin samples from dogs positive to CVL and healthy, they were included in paraffin blocks and divided into three groups: I desquamative dermatitis (DD) with 16 blocks, II ulcerative dermatitis (UD) 21 blocks and the control group (6 blocks without canine skin problems). It was used the indirect immunoperoxidase technique (IIP) to confirm the LVC diagnosis and the identification of  $\beta$ -defensins, using human primary antibodies (hBD-2 and hBD-3, SIGMA®). The experimental delineation was completely casualized, with a confidence level of 0.95. Note that there was difference ( $p = 0.03$ ) in the immunostaining intensity between groups, showing higher marcation intensity with cBD102 and cBD103 in the epidermis of the control group compared with DD and DU groups. In the dermis there was difference ( $p = 0.001$ ) of the two  $\beta$ -defensins studied, being the cBD103 expression higher than the cBD102. This study is the first one relating to the immunological interaction of the extension and intensity expression between the  $\beta$ -defensin cBD102 and cBD103 and canine visceral leishmaniasis in the DD and DU dermatological standards, assessed by immunohistochemistry.

## 1. INTRODUÇÃO

As defensinas pertencem à família de peptídeos com propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antivirais (Ganz, 2002; Bogefors et al., 2012). Estas moléculas filogeneticamente antigas têm sido encontradas em bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados, incluindo os mamíferos (Crovella et al., Ganz, 1999; 2005; Selsted et al., 2005).

As defensinas foram descobertas no início dos anos 80 (Antcheva et al., 2006). São pequenos AMPs (peptídeos antimicrobianos), ricos em arginina com peso molecular de 3 a 5 kDa (Bogefors et al., 2012). A sua localização pode ter origem em diferentes sistemas e células como os leucócitos, células de Paneth, queratinócitos, melanócitos, pneumócitos e também no sistema nervoso central. (Ganz, 2002; Selsted et al., 2005; Sun et al., 2005; Van Damme et al., 2009; Yang et al., 1999).

O nome *defensina* advém de sua funcionalidade a defesa do hospedeiro e estrutura (Antcheva et al., 2006), sendo as  $\alpha$  e  $\beta$ -defensinas muito efetivas na montagem da resposta imune contra antígenos-específicos (Lynn et al., 2010), infecções, inflamações, reparo de ferimentos e imunidade adquirida (Rock et al., 2010). Classificam-se nas famílias,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\Theta$ , (Crovella et al., 2005) sendo as  $\beta$ -defensinas as mais comuns no sistema imunomodulador dos cães (Chrudimská et al., 2010).

A maioria das defensinas atua ao penetrar na membrana citoplasmática microbiana por meio de atração elétrica (catiônicas). Uma vez penetrada formam um poro na membrana que permite o extravasamento de lisozimas. Funções como o bloqueio de proteases, quimiotaxia, ativação do sistema de complemento e síntese de citocinas (Selsted et al., 2005; Van Damme et al., 2009), são ferramentas que poderiam ser usadas para o entendimento de sinais intracelulares frente a várias enfermidades (Hill et al., 199; Van-Damme et al., 2009).

A Leishmaniose visceral canina (LVC) e a leishmaniose visceral humana (LVH) são endêmicas no Brasil (Brasil, 2003), representando um problema na saúde pública. A *Leishmania sp.*, pode residir em qualquer tipo de célula nucleada sem ser reconhecida pelo sistema imunológico e aumentando seu efeito patológico (Latz, 2010).

A resposta imune do hospedeiro frente à LVC é mediada pela resposta humoral, formação de anticorpos, ou por células efectoras do sistema fagocítico mononuclear e seus produtos como citocinas (defensinas) e quimiocinas, estimulando a resposta imune rápida e efetiva contra patógenos (Sanchez-Robert et al., 2008; Tizard, 2009).

O desenvolvimento da LVC depende do grau de imunidade do hospedeiro, pode ser restrito à pele (doença cutânea) no caso dos cães resistentes, ou os macrófagos infetados podem ganhar a circulação sanguínea e se alojar nos órgãos internos, levando a doença visceral disseminada crônica e progressiva em cães suscetíveis (Tizard, 2009). A resistência à LVC esta associada á ativação de células Th1(T – helper type 1), ou T auxiliador do tipo 1, produtoras de citocinas como a IL-2, TNF –alfa (TNF- $\alpha$ ) e principalmente IFN-gama (IFN- $\gamma$ ), aniquilando amastigotas intracelulares pela via de produção de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina (Paltnik-de Souza, 2007; Salvador-Marques, 2007; Silva et al., 2009).

Os mecanismos de resposta imune inata e seu entendimento em animais domésticos tornaram-se um alvo atual de pesquisas que podem levar a diagnósticos e tratamentos alternativos para diferentes enfermidades. Existem poucos estudos do envolvimento das defensinas na defesa do hospedeiro contra doenças causadas por protozoários em cães.

Dessa forma o objetivo da presente pesquisa é aprofundar conhecimentos em relação à  $\beta$ -defensinas bem como sua função, expressão e informação valiosa e prática para contribuir numa parte deste complexo, pouco explorado e maravilhoso mundo das DEFENSINAS.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os peptídeos antimicrobianos multifuncionais como lisozimas, defensinas e catelicinas são componentes do sistema imunológico inato (Crovella et al., 2005; Rock et al., 2010).

Seus mecanismos de ações incluem vários graus de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, e vírus. Além disso, podem atuar como canais iônicos e estimular a angiogênese. Outras pesquisas sugerem um mecanismo de reparação e proliferação celular ou também funções como mediadores de inflamação e quimiotaxia (Bogefors et al., 2012).

A combinação de funções antibióticas e de sinalização evidencia as semelhanças entre os peptídeos de defesa do hospedeiro (HPDs) durante a divergência evolutiva das sequências dos ancestrais comuns, explicando sua presença e relacionando organismos distantes (Crovella et al., 2005). Os animais superiores na escala evolutiva tem grande interação entre os invasores microbianos e suas células de defesa, geralmente nas superfícies epiteliais como pele, trato gastrointestinal, reprodutivo, urinário e respiratório (Linde et al., 2008; Leonard et al., 2012). Estudos recentes demonstram a importância desses peptídeos na pele, especificamente na epiderme, onde constituem uma importante barreira imunológica contra bactérias e outros agentes patógenos (Asano et al., 2008).

Nos últimos vinte anos, centenas de peptídeos antimicrobianos tem sido encontrados em células de plantas e fluidos corporais de animais multicelulares, desde moluscos até humanos. Alguns peptídeos antimicrobianos são produzidos como respostas induzidas frente à infecção ou inflamação. (Rock et al., 2010; Leonard et al., 2012).

Os HPDs possuem grande variedade de tamanhos e formas moleculares. Em geral, HPDs tem a capacidade de interagir com componentes da parede celular microbiana, sua cationicidade favorece a interação eletrostática com superfícies aniônicas microbianas. A polaridade dos resíduos moleculares permite a interação entre estes e a membrana citoplasmática, já que ambos possuem estrutura molecular de natureza semelhante. (Crovella et al., 2005).

Entre os muitos tipos estruturais de HDPs, as defensinas e as catelicinas são preponderantes (Steinstraesser et al., 2011).

## 2.2 DEFENSINAS E B-DEFENSINAS

Bioquimicamente, as defensinas são formadas por pontes de cisteínas, com que possuem evidente eficiência na diminuição da incidência, tamanho e a multiplicação de lesões de pele, induzidas pela exposição à luz, como a ocorrência de carcinomas de células escamosas (Hill et al., 1991, Jimenez et al., 2003). São considerados uma linha de peptídeos pequenos (25-49 aminoácidos) que adotam uma conformação anfipática  $\alpha$ -hélice ou de lâminas- $\beta$  e pontes-dissulfeto estáveis entrando em contato com a superfície microbiana de bactérias, artrópodes, anfíbios, mamíferos, fungos, plantas, moluscos. (Steinstraesser et al., 2011).

Relacionando-as entre espécies diferentes tipos de defensinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\theta$ ) são variavelmente presentes nos mamíferos, e são expressas por macrófagos, monócitos, células dendríticas e células epiteliais (Crovella et al., 2005; Bogefors et al, 2012).

Tanto as alfas ( $\alpha$ ) quanto as betas ( $\beta$ ) defensinas, são muito efetivas na montagem da resposta imune contra antígenos-específicos (Lynn et al., 2010; Bogefors et al., 2012).

Entre os três tipos de defensinas, na década dos 80a, as  $\alpha$ -defensinas foram às primeiras moléculas a serem identificadas como ricas em cisteína, componentes de neutrófilos e células fagocíticas dos mamíferos. Na sequência, no início da década de 90a as  $\beta$ -defensinas foram identificadas nos epitélios e leucócitos de mamíferos (Leonard et al., 2012; Antcheva et al, 2006). As  $\beta$ -defensinas são as mais comuns no sistema imunológico dos cães (Chrudimská et al., 2010).

Como muitos peptídeos antimicrobianos, as defensinas são moléculas catiônicas (polar) espacialmente carregadas e com regiões hidrofóbicas. (Ganz, 1999; Crovella et al., 2005). Este arranjo permite a inserção de fosfolipídios na membrana e que as regiões hidrofóbicas fiquem ocultas com a sua membrana oleosa interna e suas regiões catiônicas interagem com cabeças de fosfolipídios aniônicos e a água (anfipáticas), dessa forma, atuam como antibióticos e moléculas de sinalização (Ganz, 1999; Diao et al., 2007; Lynn et al., 2010).

A ponte estabelecida pelas  $\beta$ -defensinas entre a imunidade inata adaptativa acontece na superfície de mucosas e na pele (Yang et al., 1999), sua ação antibacteriana envolve permeabilização das células-alvo como um passo crucial. Ademais a atividade antiviral de

algumas defensinas parece envolver ligação a glicoproteínas de membrana (Crovella et al., 2005). Entre as suas diversas funções imunológicas e não imunológicas incluem-se: bloqueio de proteases e transcriptase reversa, ativação do sistema de complemento, síntese de citocinas, além da diferenciação de tecidos reprodutivos, cor preta na pelagem dos cães, maturação espermática e propriedades analgésicas (Crovella et al., 2005; Candille et al., 2007; Bogefors et al., 2012; Leonard et al., 2012).

Em resposta a infecção as defensinas são produzidas pelos neutrófilos em questão de minutos a horas alcançando níveis máximos no organismo em 24 horas (Tizard, 2000; Ganz, 2002). São moléculas “especialistas” fazendo um tipo de bloqueio imunológico frente aos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). A propriedade quimiotáctica das defensinas esta baseada nos sinais intracelulares transmitidas à outras células de defesa do hospedeiro estabilizando uma ligação entre elas e o sistema imune adaptativo (Leonard et al., 2012). Essa propriedade quimiotáctica das  $\beta$ -defensinas foi estudada especialmente na  $\beta$ -defensinas hBD-1 ( $\beta$ -defensina humana 1) e hBD-2 ( $\beta$ -defensina humana 1). A hBD1 constitutivamente induzida e está expressa nos túbulos renais e em menor grau no pâncreas e outros sítios epiteliais; a hBD2, também é produzida normalmente e de forma induzida na pele e outros epitélios durante a inflamação (Yount et al., 2009; Steinstraesser et al., 2011; Bogefors, et al., 2012). Apenas concentrações micro molares destas defensinas são capazes de atrair células dendríticas e células T de memória, iniciando a resposta imune secundária. Como as  $\beta$ -defensinas, os neutrófilos humanos e as  $\alpha$ -defensinas também atraem células T. Além disso, algumas defensinas também bloqueiam receptores adrenocorticotróficos e podem inibir a produção de hormônios adrenais imunodepressores numa infecção aguda (Selsted et al., 2005; Erles et al., 2010; Leonard et al., 2012).

### **2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)**

A LVC é uma zoonose de grande importância em saúde pública, sendo causada por um protozoário intracelular do gênero leishmania (*L. chagassi*) e transmitida pela picada de insetos flebotomíneos que compreendem o gênero *Lutzomyia longipalpis* “ou mosquito palha” (Baleeiro et al., 2006; Baneth et al., 2008; Nogueira et al., 2009; Junior et al., 2012). A sua distribuição mundial é ampla, estes parasitas atualmente infectam mais de 20 milhões de pessoas em todo o

mundo, com incidência anual de 3 milhões por ano de novas infecções em pelo menos 88 países (McGwire et al., 2010). No Brasil a *Leishmania (L) chagassi* é endêmica, possuindo ampla distribuição, no estado de Minas Gerais. Em Belo Horizonte, ocorreram aproximadamente 100 casos anuais com alta letalidade, em média 13,5%, variando de 6,3% no ano de 1996 a 23,6% em 2009. (Junior et al., 2012).

A espécie canina é considerada o principal reservatório doméstico da *Leishmania chagassi*, constituindo parte do ciclo epidemiológico de transmissão ao homem (Brasil, 2003; Rosypal et al., 2007).

## **2.4 INTERAÇÃO DA LVC COM O SISTEMA IMUNOLÓGICO**

Após a inoculação das formas promastigotas ocorre fagocitose por macrófagos e a transformação em amastigotas ativando assim a sua multiplicação dentro dos fagócitos ocasionando sua ruptura (Vesely et al., 2012). A resistência à destruição intracelular é resultante de múltiplos mecanismos. O lipofosfoglicano da *leishmania* atrasa a maturação do fagossoma impedindo a produção de óxido nítrico e inibindo muitas das respostas dos macrófagos às citocinas (McGwire et al., 2010). O parasita também suprime a habilidade da apresentação de antígenos dos macrófagos por meio da supressão da expressão do MHC-II (complexo maior de histocompatibilidade tipo II). Com a evolução e cronicidade da infecção, há formação de granulomas caracterizados pela presença de granulócitos, macrófagos, células NK (natural killer) e linfócitos (Papadogiannakis et al., 2005). Os cães que mostram resistência a doença desenvolvem uma resposta mediada por linfócitos T auxiliares 1 estimulados pela IL-12 secretadas pelas células dendríticas ou macrófagos, como predominância de anticorpos que geram uma forte e eficaz resposta celular produzindo hipersensibilidade tardia induzida por citocinas como IFN- $\gamma$  essenciais para estimular os macrófagos e destruir os parasitas. Ressalta-se que a maioria dos cães com LVC é resistente: apenas 10% dos cães infectados desenvolvem a doença clínica (Engwerda et al., 2004; Silva, 2007; Tizard, 2009).

No outro lado do espectro, os cães suscetíveis à doença mostram uma resposta mediada por linfócitos T auxiliares 2 (Th<sub>2</sub>) onde há predominância de IL-10, inibidor de macrófagos ativados, IL-12, TNF (fator de necrose tumoral) e MHC-II, desta forma mantendo a resposta Th-2 e desenvolvendo formação excessiva de imunocomplexos ocasionando vasculites e

glomerulonefrite, anemia hemolítica, insuficiência renal e morte (Solano-Gallego et al., 2000; Papadogiannakis et al., 2005; Silva, 2007; Tizard, 2009).

São vários os mecanismos de evasão imunológica do parasita, produto de uma longa evolução e adaptação ao longo do tempo. A *leishmania* pode evitar a ligação com os neutrófilos e subsequente fagocitose; promover o desenvolvimento de células reguladoras e supressoras ou estimular a proliferação do “pool” de linfócitos B até a sua exaustão, destruir o hospedeiro por médio das infecções secundárias, perder ou alterar a sua antigenicidade glicoproteica de superfície burlando eficazmente o sistema imunológico e até criar novas populações produzindo picos de latência no hospedeiro (Tizard, 2009).

Cães com persistência das imunoglobulinas IgG1 e IgG2 no seu sistema imunológico indicam maior susceptibilidade para a LVC. Estudos recentes (Solano-Gallego, 2000) tem demonstrado que a resposta imunológica do hospedeiro pode variar em função da raça do paciente, podendo inclusive ser passível de manipulação genética. (Silva, 2007). A raça *Ibizian hound* tem mostrado resistência natural contra a LVC pelo gene *Nramp* o qual codifica uma proteína transportadora de íons (*Nramp 1*) na membrana do fagossomo com a finalidade de produção de óxido nítrico (monóxido de nitrogênio), o qual se liga a enzimas que contêm metais como a ribonucleotídeo redutase impedindo a sínteses de DNA e inibindo o crescimento do parasita (Tizard, 2009) .

## **2.5 PADRÃO DERMATOLÓGICO: DERMATITE DESCAMATIVA (DD) E DERMATITE ULCERATIVA (DU)**

Na LVC é predominante dois tipos de dermatites, tendo relevancia na evolução e pronostico dopaciente. A dermatite descamativa (DD): caraterizada por descamação seca generalizada, pelame sem brilho e frágil, alopecia com distribuição simétrica, periocular blateral e hiperqueratose nasal foram as características clínicas deste grupo de cães. Este padrão dermatológico esta associado a uma maior imunidade a infecção (Papadogiannakis et al., 2005).

Dermatite ulcerativa (DU): úlceras generalizadas em varios regiões do corpo: periocular, narinas, face e lábio. Este padrão dermatológico esta associado a uma resposta imune fraca, desenvolvendo-se no hospedeiro, sintomatologia marcada e morte (Salvador-Marques, 2007).

### **3. JUSTIFICATIVA**

A busca de novos entendimentos sobre a resposta imunológica do hospedeiro frente à *Leishmania spp* é a principal motivação desse estudo. Recentes pesquisas (Auvynet & Rosenstein, 2009; Van-Damme et al., 2009; McGwire et al., 2010; Steintraesser et al., 2011; Erles et al., 2012) tem demonstrados resultados controversos em relação a atividades antimicrobianas dos peptídeos em algumas enfermidades crônicas nos cães. Pesquisas sobre novas moléculas que podem para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para essa importante enfermidade.

#### **4. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem como objetivo avaliar a expressão de  $\beta$ -defensinas (cBD102 e cBD103) em cães acometidos por LVC.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Identificar a intensidade e extensão da expressão das  $\beta$ -defensinas na pele de cães acometidos por LVC.
- ✓ Comparar a expressão de  $\beta$ -defensinas (cBD102 e cBD103) na epiderme e derme de cães com dermatite ulcerativa e descamativa acometidos por LVC.
- ✓ Confrontar a expressão das  $\beta$ -defensinas (cBD102 e cBD103) em relação a carga parasitária na pele de cães acometidos por LVC.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 AMOSTRAS DE TECIDOS INCLUÍDOS EM PARAFINA (BLOCOS)**

Foram usadas amostras de pele incluídas em parafina provenientes dos arquivos dos setores de histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP/Botucatu).

Foram utilizadas no total, 43 amostras provenientes de animais acometidos por LVC e seis amostras animais não dermatopatas (grupo controle). As amostras foram divididas em dois grupos, de acordo com as formas dermatíticas mais comuns apresentadas por cães positivos para *Leishmania*: dermatite descamativa (DD) e dermatite ulcerativa (DU). O grupo I (DD) foi composto por 16 amostras incluídas em parafina, e o grupo II (DU) por 21 amostras.

Segundo as histórias clínicas das amostras utilizadas, as biopsias excisionais foram obtidas na região frontal da cabeça para os cães com dermatite descamativa do grupo um e da região úmero-radio-ulnar (cotovelo) para os cães com dermatite ulcerativa do grupo dois.

### **5.2 PREPARO DA LÂMINA HISTOLÓGICA**

Para cada caso foram confeccionadas lâminas histológicas, utilizando a coloração Hematoxilina e Eosina (HE), para confirmação de processo infeccioso-inflamatório e amastigotas.

Os três grupos (DD, DU, Controle) seguiram os protocolos de rotina para confecção das lâminas histológicas. Após a microtomia com cortes de 4 $\mu$  as lâminas foram desparafinizadas, reidratadas, coradas pela técnica de HE de Mayers e recobertas com lamínulas em resina sintética. Foram usadas lâminas silanizadas especiais<sup>1</sup> com o intuito de conservar a aderência do corte na lâmina, e garantir ótimo processamento imunoistoquímico.

### 5.3 CONFIRMAÇÃO DE CASOS POSITIVOS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Além das análises histopatológicas coradas pela HE, confirmou-se o diagnóstico de LVC pela técnica imunoistoquímica de imunoperoxidase indireta (IPI). O anticorpo primário específico contra leishmaniose visceral canina, anti-leishmania<sup>2</sup> foi produzido no Departamento de Patologia da FMVZ/UNESP (FIG 1.). A contagem das amastigotas foi feita em campos aleatórios na totalidade da lâmina usando objetivas de 200 e X400, e avaliando mediante os escores usados para a avaliação da extensão descritos embaixo.

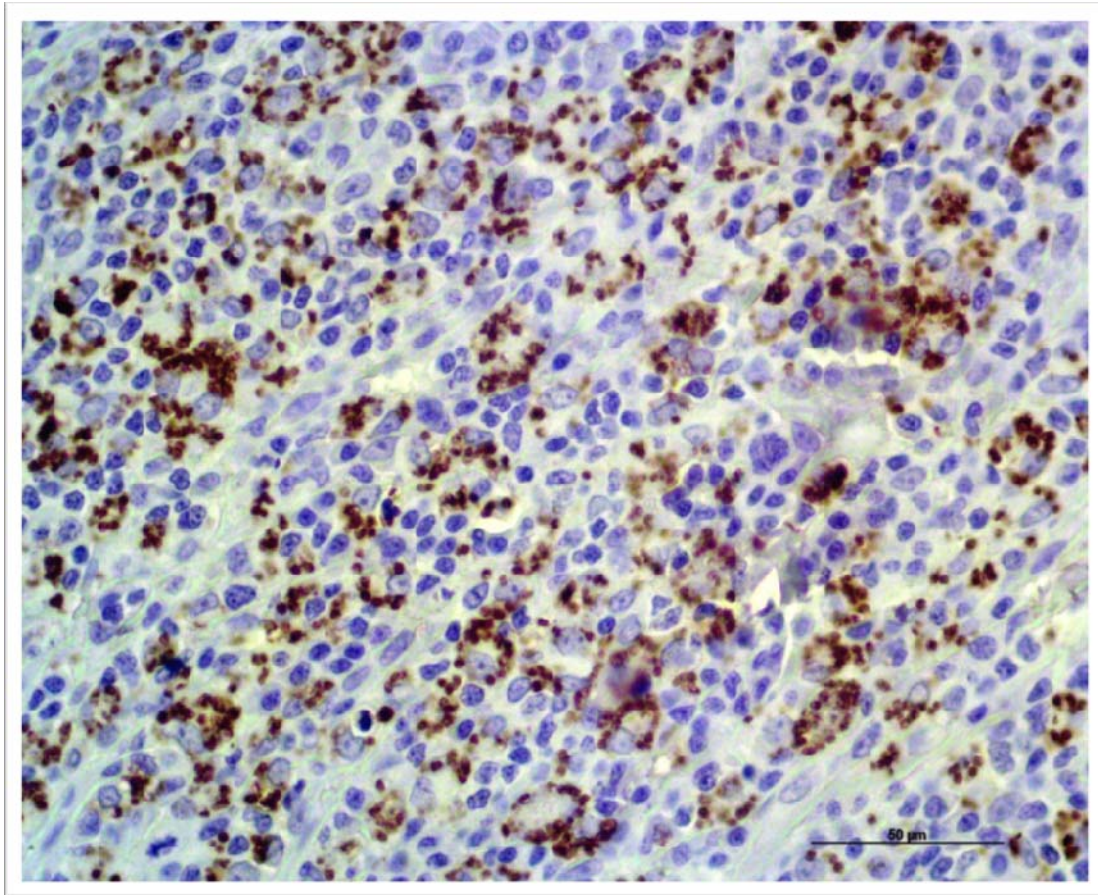
---

<sup>1</sup>STAR FROST®. Lâminas para microscopia 26x76x1.0mm. Caixa c/50 unidades embaladas em celofane-KNITTEL.

<sup>2</sup>ANTICORPO ANTI-LEISHMANIA. Produzido no departamento de Patologia veterinária da UNESP, Botucatu.

<sup>3</sup>hBD102 . DEFB4.. Cod.D9690-5UG. Recombinant, expressed in *E. coli* lyophilized powder - SIGMAALDRICH®

<sup>4</sup>hBD103. DEFB103. Cod. D2444-100 UG. Synthetic peptide corresponding to an internal sequence of human  $\beta$ -defensin 3 - SIGMAALDRICH®



**Figura 1.** Comprovação da leishmaniose visceral canina pela técnica imunoistoquímica de Imunoperoxidase indireta (IPI): inúmeras formas amastigotas marcadas da cor marrom pelo anticorpo primário anti-leishmania (X400)

#### **5.4 OS HOMÓLOGOS DAS B-DEFENSINAS CBD102 E CBD103**

Para a detecção das  $\beta$ - defensinas (cBD102 e cBD103) na pele dos cães, foi utilizado as  $\beta$ - defensinas humanas, pela fácil disponibilidade no mercado. Os homólogos das  $\beta$ - defensinas caninas em humanos são as  $\beta$ -defensina 2 (hBD-102) e  $\beta$ -defensina 3 (hBD-103).

## 5.5 TÉCNICA DA IMUNOISTOQUÍMICA PARA AVALIAÇÃO DE CBD102 E CBD103

Foi utilizado um anticorpo policlonal de coelho anti  $\beta$ -defensinas hBD102<sup>3</sup> e hBD103<sup>4</sup>, empregada com o sistema Envision<sup>5</sup>.

Após os cortes de 4 $\mu$ m, as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 56°C “overnight” e colocados em cuba plástica ao banho maria à temperatura de 96°C submergidos em Trilogy<sup>6</sup> durante 30 minutos. Em seguida, o material foi resfriado por 20 minutos à temperatura ambiente, seguida por várias lavagens com água deionizada, prosseguindo com o bloqueio da peroxidase endógena utilizando metanol (CH<sub>3</sub>OH) 92% junto com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 8%. Após nova sequência de lavagens com água deionizada, a amostra foi delimitada pela caneta hidrofóbica Dako Pen<sup>7</sup>, para otimizar o uso dos cortes e facilitar o contato do tecido com os anticorpos primários hBD102 e hBD103 que foram diluídos em concentração de 1:300 cada um, seguindo as indicações do fabricante Sigma Aldrich<sup>®</sup> em diluente para anticorpo primário da Dako<sup>®</sup>. Após a diluição, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários por 17 horas a temperatura de 4°C. Depois da lavagem em solução de tampão TRIS com pH de 7,4 procedeu-se ao secagem das lâminas, e posteriormente foi utilizado o sistema de detecção Envision<sup>®</sup> por uma hora à temperatura de 27°C.

A revelação da reação foi visualizada usando o substrato cromógeno DAB<sup>8</sup> e contra corados com Hematoxilina de Mayer. A desidratação foi feita em soluções de álcool ascendentes (3 minutos cada um 85%, 95%, Absoluto I, Absoluto II e Absoluto III), xilol por duas vezes com espera de 3 minutos para cada imersão e montados em seguida com Entellan<sup>®9</sup>.

No caso das reações para o controle negativo, foi utilizada a mesma técnica, porém omitindo o anticorpo primário, substituindo por solução tampão TRIS.

---

<sup>5</sup> ENVISION + DUAL SYSTEM, Peroxidase, cod K4061- DakoCytomation

<sup>6</sup> TRILOGY<sup>™</sup> Pretreatment Solution. Cod. 920P- Cell Marque Corporation

<sup>7</sup> DAKO PEN. Water Repelling. Cod. S200230 - Dako<sup>®</sup>

<sup>8</sup> DIAMINOBENZEDINA. Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System. Cod.K3466-Dako<sup>®</sup> North America, Inc

<sup>9</sup> ENTELLAN<sup>®</sup>. Meio para montagem rápida, para a microscopia. Cod. 1079600500 –Merck Millipore International

## **5.6 ESCORES NA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA NA EXPRESSÃO DE EXTENSÃO E INTENSIDADE DAS B-DEFENSINAS**

As lâminas foram avaliadas na sua totalidade, aleatoriamente com objetivas de X100, X200 e X400, em relação a extensão e intensidade da imunomarcação nas células da derme e epiderme.

Os escores da expressão de extensão e intensidade, foram feitos de acordo com os critérios descritos por Pinho et al., (2005). A avaliação foi feita por dois avaliadores, sendo um análise independente por cada um deles.

O grau da extensão da imunomarcação na derme e epiderme foi avaliado em cinco escores: negativo (0) quando não houve expressão celular; (1) 1-25% - muito fraca; (2) 26-50% - fraca; (3) 51-75% - moderada, e (4) 76-100% - intensa.

A intensidade da imunomarcação na derme e epiderme foi avaliada e quatro escores: (0) não houve marcação; (1) marcação fraca; (2) marcação moderada; (3) marcação forte.

Além das análises de expressão de extensão e intensidade na pele, foram feitas correlações de extensão das  $\beta$ -defensinas (cBD102 e cBD103) com a carga parasitária.

## **5.7 DIGITALIZAÇÃO DAS IMAGENS**

As imagens das lâminas foram obtidas utilizando uma câmera digital, modelo AxioCamERc 5.8 da marca Carl Zeiss<sup>®</sup>, acoplada ao microscópio Trinocular Axio Lab.A1, com iluminação transmitida Hal 35 watts com auxílio das objetiva de 20X, 40X e 100X da marca Carl Zeiss<sup>®</sup>, editadas pelo programa de análise morfométrica Axio Vision LE release, da mesma marca.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação da expressão de extensão e intensidade das defensinas na derme e epiderme foi utilizado o método de análise de variância ANOVA, no qual foi considerado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 com 43 repetições, sendo dois tipos de proteínas (cBD102 e cBD103) e três grupos dermatológicos (DD, DU e controle). Uma vez detectado o efeito significativo dos efeitos (proteínas, grupo e interação) via teste F ( $p < 0,05$ ), empregou-se o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidades para detectar diferenças entre os níveis de cada efeito. Tal análise foi realizada por meio do procedimento GLM do software SAS<sup>®</sup> (SAS INSTITUTE 9.0).

Em relação à análise de concordância entre os dois avaliadores, foi usado o coeficiente de correlação de Spearman (procedimento CORR do SAS<sup>®</sup>) entre as notas atribuídas pelos dois avaliadores para todas as variáveis estudadas: expressão da extensão e intensidade da cBD102 e cBD103 dentro de cada padrão dermatológico, com o intuito de respaldar os dados obtidos dos testes estatísticos usados e aumentar a confiabilidade desta pesquisa (Tabela 1).

**Tabela 1.** Coeficiente de Concordância Spearman entre os avaliadores quando utilizada  $\beta$ -2 e  $\beta$ -3 dentro das variáveis extensão e intensidade para os grupos positivos com dermatite descamativa, ulcerativa e grupo controle na epiderme e derme.

Grupos	Epiderme				Derme			
	$\beta$ -2		$\beta$ -3		$\beta$ -2		$\beta$ -3	
	Ext.	Int.	Ext.	Int.	Ext.	Int.	Ext.	Int.
DD	86%	100%	49%	82%	95%	96%	54%	84%
	p=0,001	p=0,001	p=0,052	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,03	p=0,001
DU	81%	72%	74%	87%	94%	86%	94%	97%
	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001
Controle	100%	100%	100%	100%	-	-	-	-
	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001				

DD= Dermatites Descamativa; DU = Dermatites Ulcerativa; Ext. = Extensão; Int. = Intensidade;

p= Probabilidade.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 EXPRESSÃO DA EXTENSÃO E INTENSIDADE DE B-DEFENSINAS (CBD-102 E CBD-103) NA EPIDERMIS:

A tab. dois ilustra, para os distintos grupos, os resultados da expressão epidérmica das defensinas em relação à extensão e à intensidade.

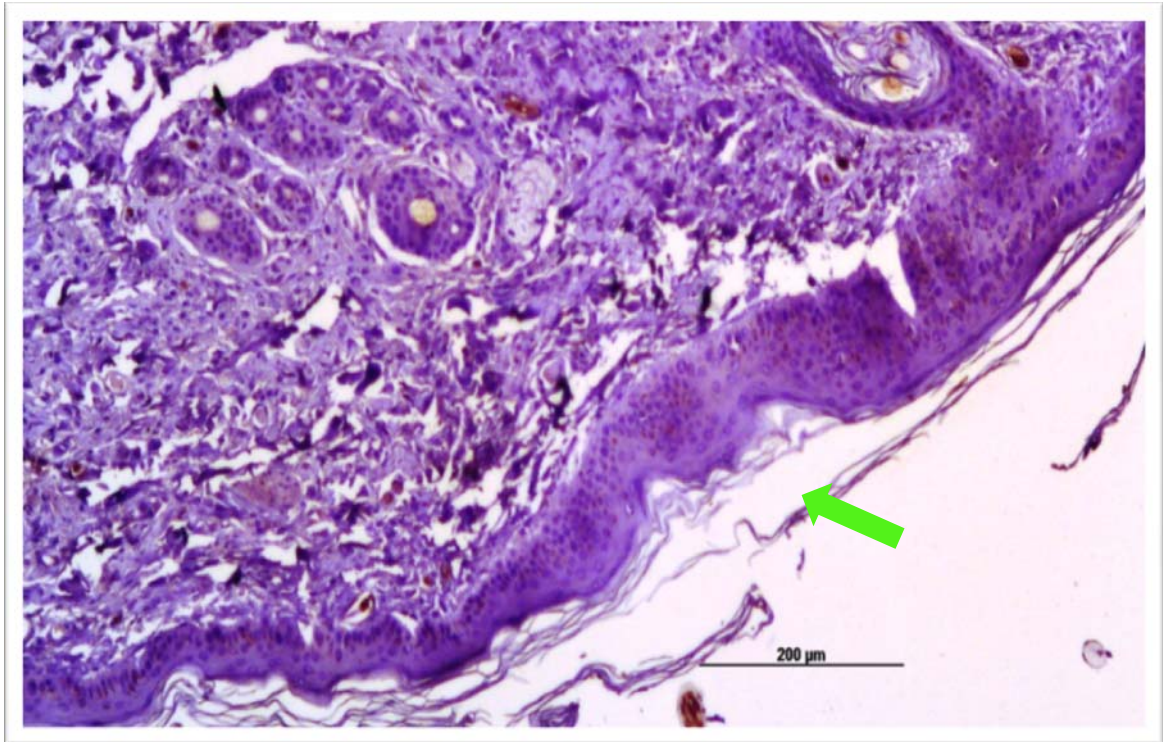
Observa-se que não houve diferença na expressão da extensão de cBD102 e cBD103 ( $p=0.918$ ) entre os grupos para a mesma defensiva (figura 2 e 3), entretanto houve diferença significativa ( $p=0.002$ ) entre a expressão de cBD103 e cBD102, sendo a expressão de extensão da cBD103 superior a cBD102

No tocante, a intensidade houve diferença ( $p=0,003$ ) entre o grupo controle e os grupos DD e DU, observando-se maior intensidade de marcação da cBD102 e cBD103 no grupo controle quando comparados com os grupos DD e DU. Entre tanto, nota-se que a expressão da cBD102 dentro de cada grupo (figura 4 e 5) foi semelhante a expressão da cBD103 ( $p=0,751$ ).

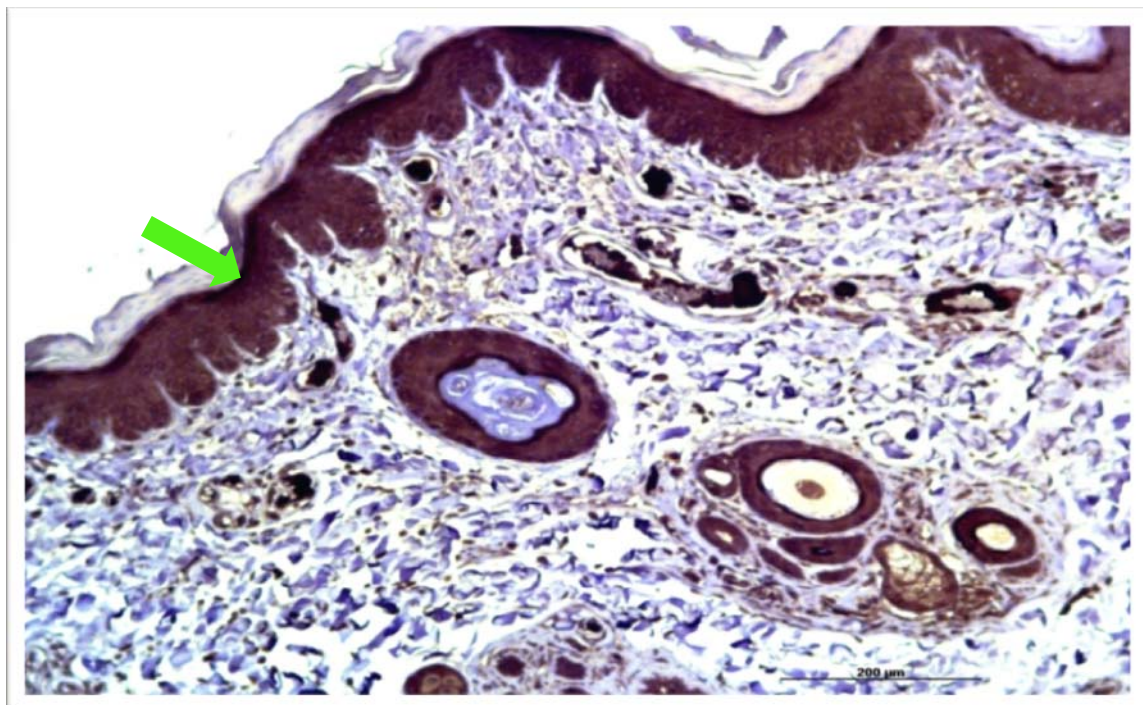
**Tabela 2.** Extensão e intensidade da expressão de  $\beta$ -defensinas cBD-102 e cBD-103 na epiderme de animais com dermatite descamativa (DD) e dermatite ulcerativa (DU) decorrentes de leishmaniose visceral canina

Expressão/Grupos	EPIDERMIS					
	cBD102			cBD103		
	DD	DU	Controle	DD	DU	Controle
Extensão	71,1 <sup>a</sup>	75 <sup>a</sup>	75 <sup>a</sup>	96,1 <sup>b</sup>	87,5 <sup>b</sup>	87,5 <sup>b</sup>
Intensidade	60,4 <sup>a</sup>	58,7 <sup>a</sup>	83,3 <sup>b</sup>	56,2 <sup>a</sup>	54,8 <sup>a</sup>	94,4 <sup>b</sup>

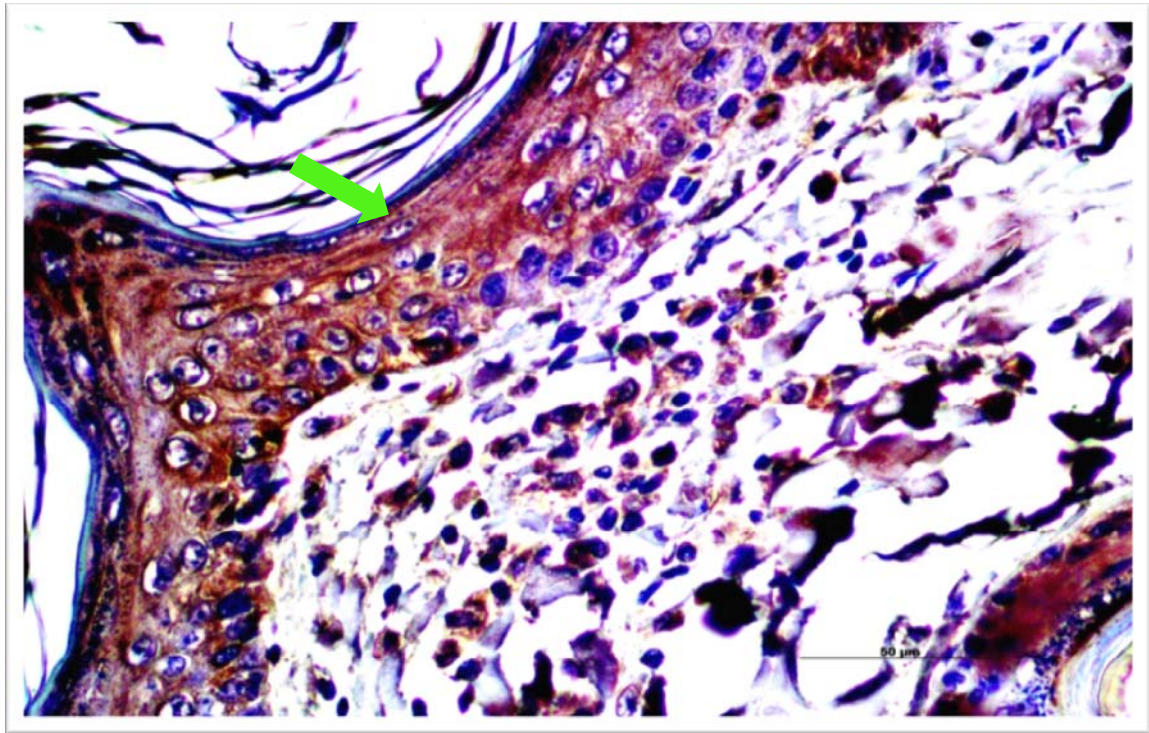
As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.



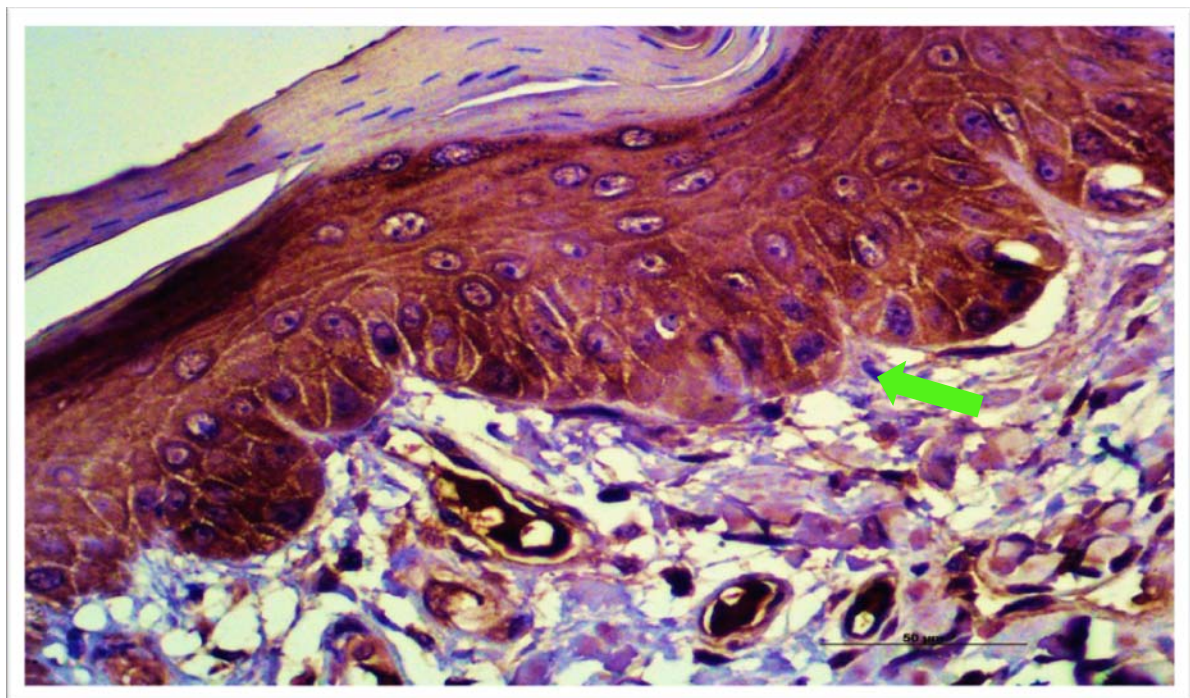
**Figura 2.** Nota-se a baixa expressão de extensão representada com a cor marrom da  $\beta$ -defensina cBD102 comparada com a cBD103 na epiderme (➡) de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DD (X 200).



**Figura 3.** Nota-se a maior expressão de extensão da  $\beta$ -defensina cBD103 comparada com a cBD102 representada com a cor marrom na epiderme (➡) de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DU (X 200).



**Figura 4.** Note-se a expressão de intensidade da  $\beta$ -defensina cBD102 corada de marrom na epiderme (➡) de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DD (X 400).



**Figura 5.** Note-se a expressão de intensidade sem diferença significativa da  $\beta$ -defensina cBD103 frente a cBD102 corada de marrom na epiderme (➡) de pacientes acometidos por LVC dentro do grupo DU (X 400).

## 7.2 EXPRESSÃO DA EXTENSÃO E INTENSIDADE DE B-DEFENSINAS (CBD102 E CBD103) NA DERME

A tabela três relaciona, para os distintos grupos os resultados da expressão na derme das defensinas em relação à extensão e à intensidade.

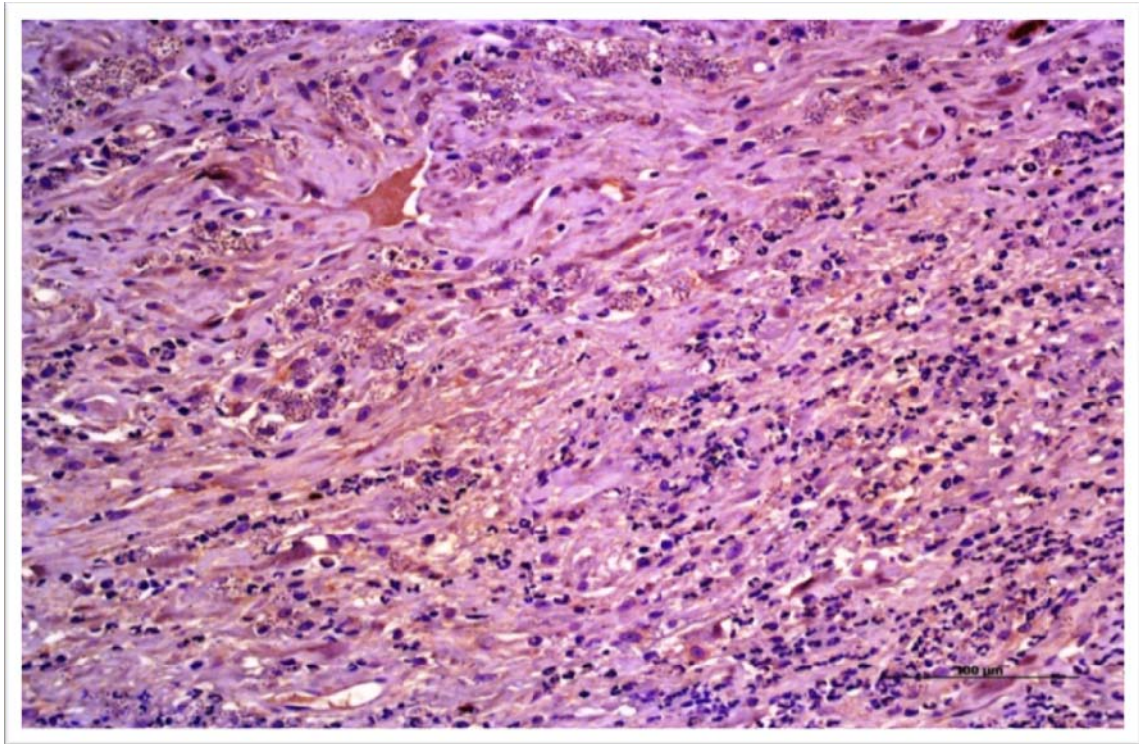
Pode-se evidenciar que não houve diferença ( $p=0,06$ ) na expressão da extensão de cBD102 e cBD103 (figura 6 e 7) dentro de cada grupo; entretanto houve diferença ( $p=0,001$ ) entre a extensão das duas  $\beta$ -defensinas estudadas entre os grupos, sendo a expressão de cBD103 superior a de cBD102.

**Tabela 3.** Extensão e intensidade da expressão de  $\beta$ -defensinas cBD102 e cBD103 na derme de animais com dermatites descamativa (DD) e dermatites ulcerativa (DU) decorrentes de leishmaniose visceral canina

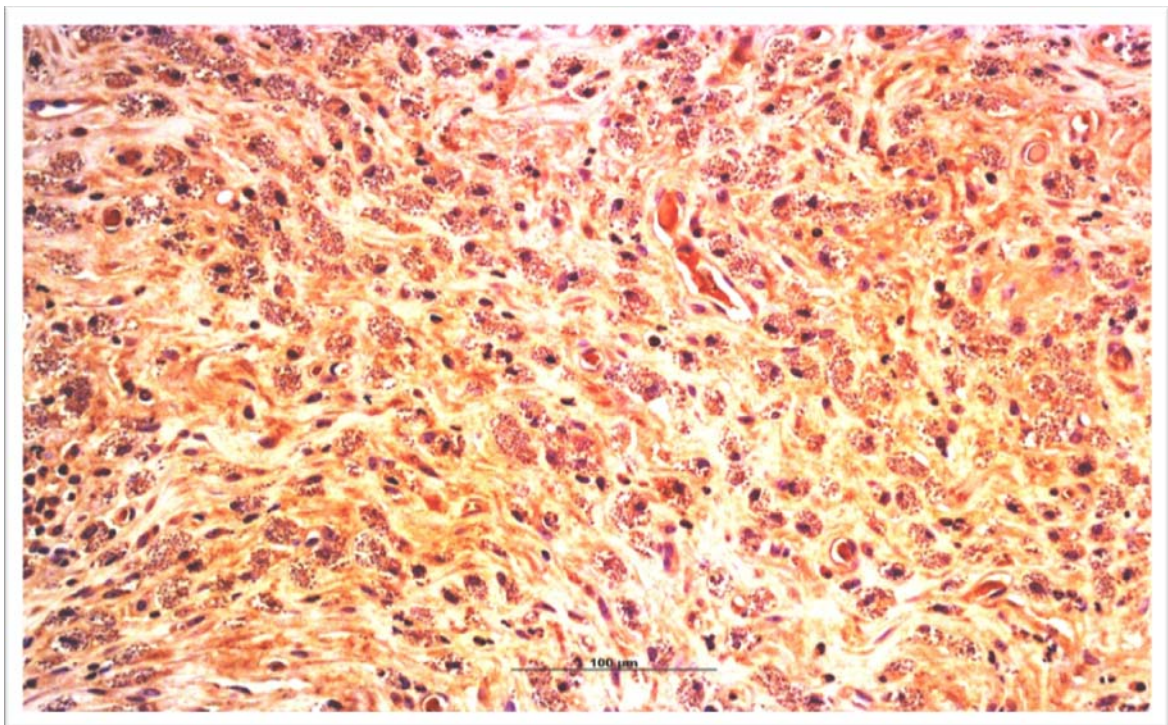
Expressão/Grupos	DERME			
	cBD102		cBD103	
	DD	DU	DD	DU
Extensão	52,3 <sup>a</sup>	64,3 <sup>a</sup>	86,7 <sup>b</sup>	83,9 <sup>b</sup>
Intensidade	53,1 <sup>a</sup>	59,5 <sup>a</sup>	78,1 <sup>b</sup>	73,8 <sup>b</sup>

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

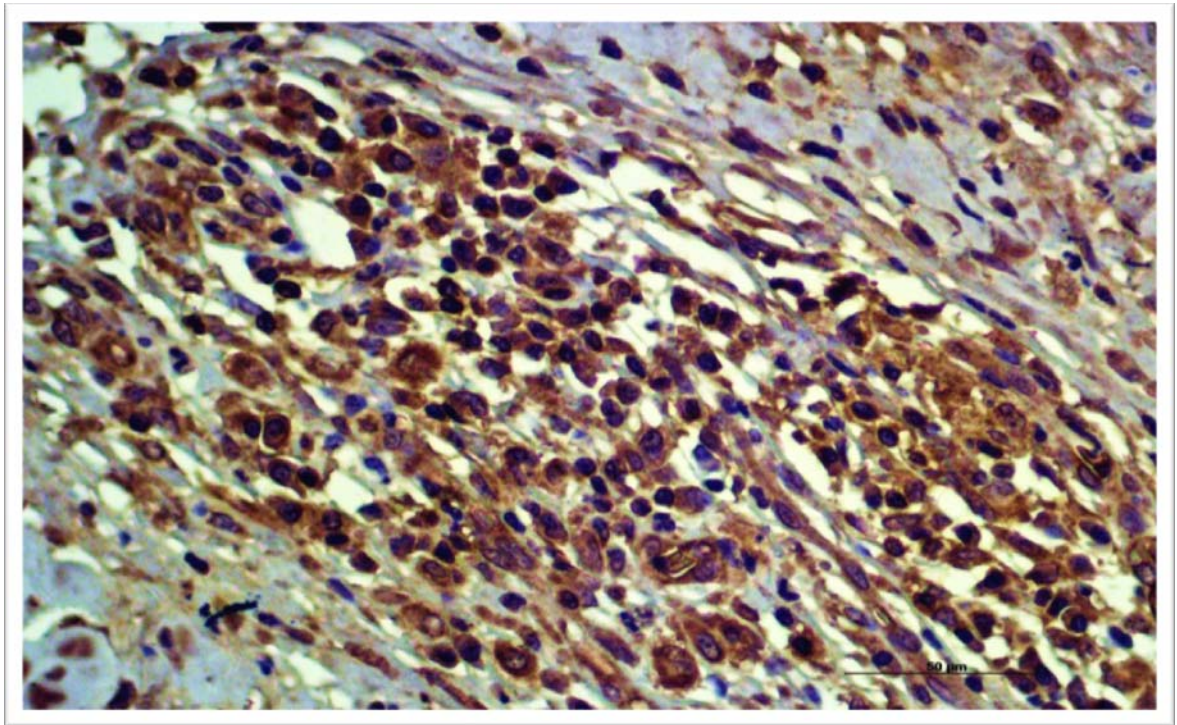
Na avaliação da intensidade houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,002$ ) entre as duas  $\beta$ -defensinas, observando-se maior expressão para cBD103 quando comparada com a cBD102 (figura 8 e 9). No entanto a análise referente aos grupos de interesse DD e DU, não apresentaram diferenças significativas ( $p=0,943$ ).



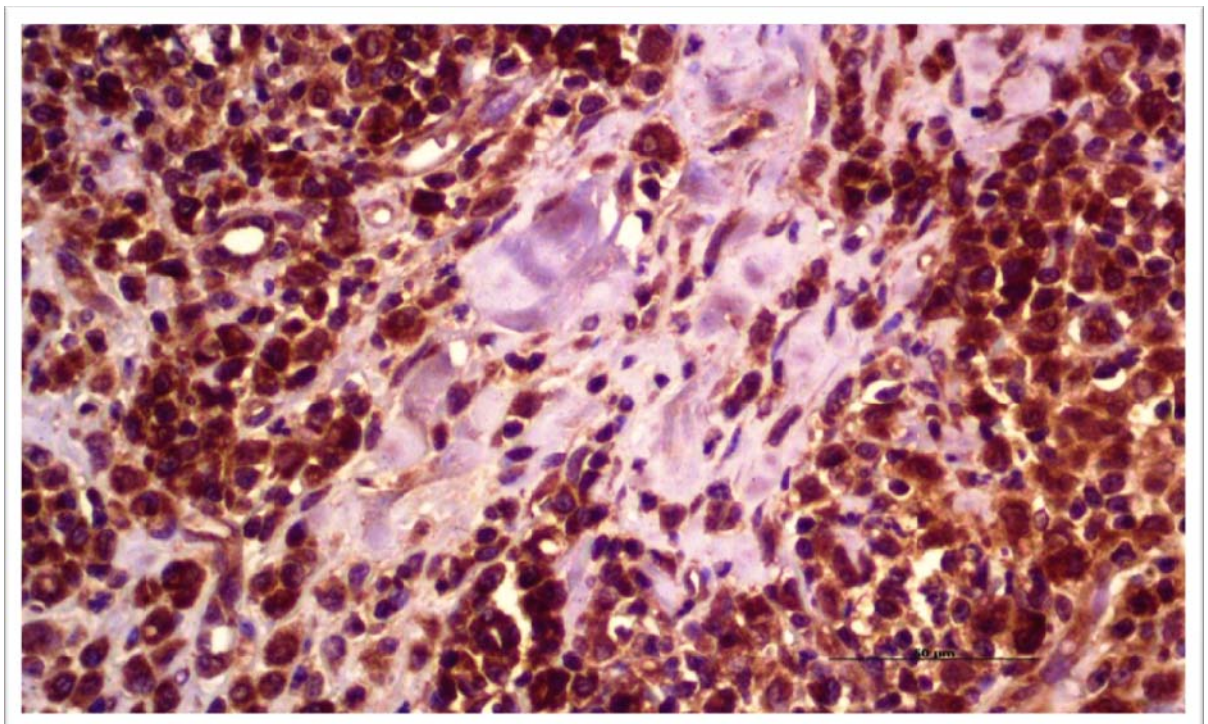
**Figura 6.** Note-se a expressão de extensão da  $\beta$ -defensina cBD102 na derme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DD (X 200).



**Figura 7.** Note-se a expressão de extensão mais marcada da  $\beta$ -defensina cBD103 frente na cBD102, corada de marrom na derme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DD (X 200).



**Figura 8.** Note-se a expressão de intensidade da  $\beta$ -defensina cBD102 coradas de marrom na derme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DU (X 400).



**Figura 9.** Note-se em um grau mais forte a expressão de intensidade da  $\beta$ -defensina cBD103 frente a cBD102, na derme de pacientes acometidos por LVC, dentro do grupo DU (X 400).

Não foi observada correlação entre a carga parasitária e à expressão de extensão da cBD102 ( $p>0,05$ ) e cBD103 ( $p>0,05$ ) tanto para dermatite descamativa como para a dermatite ulcerativa (figura 18 e 19).

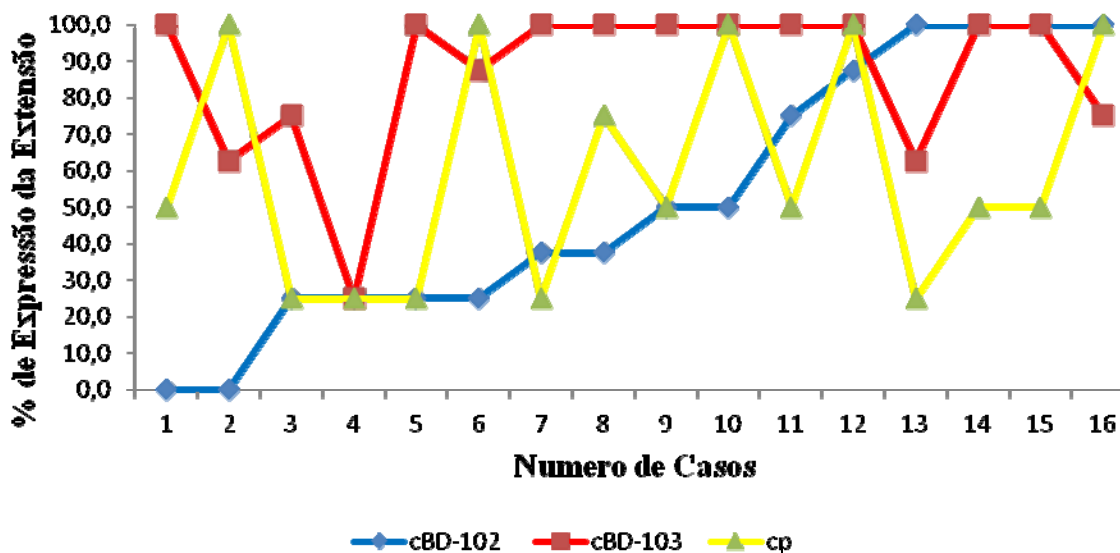


Figura 10. Correlação da expressão de extensão da cBD102 e cBD103 com a carga parasitária de pacientes acometidos pela LVC com dermatite descamativa

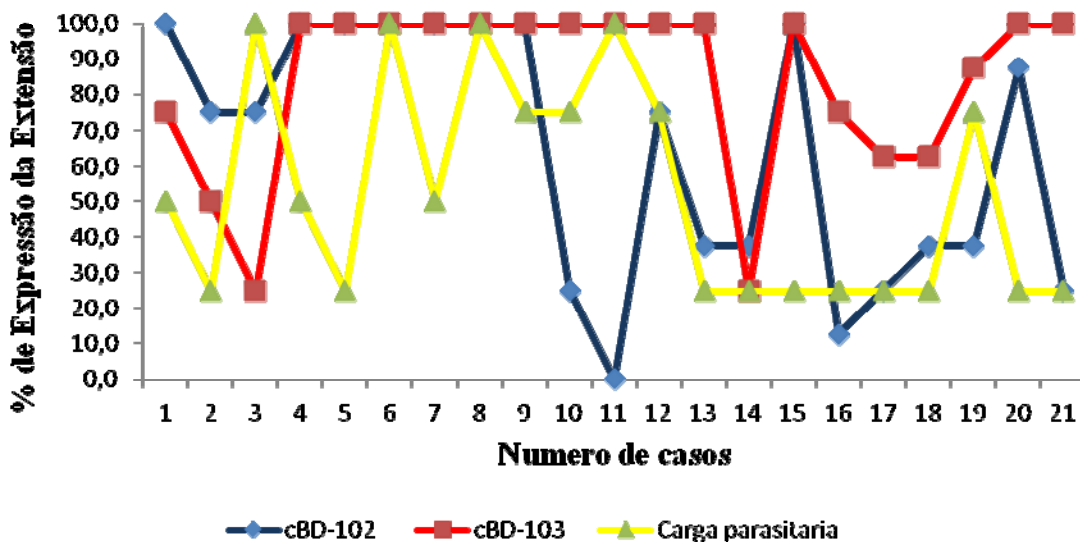


Figura 11. Correlação da expressão de extensão da cBD102 e cBD103 entre a carga parasitária de pacientes acometidos pela LVC com dermatites ulcerativa

## 8. DISCUSSÃO

De acordo com o conhecimento dos autores o presente estudo é o primeiro que trata da expressão das B defensas nos casos de LVC.

A maioria dos trabalhos feitos com defensas descreve o seu potencial contra bactérias, fungos e vírus (Candille et al., 2007; Van Damme et al., 2009; Erles et al., 2010; Bogefors et al., 2012; Leonard et al., 2012).

Nos casos em que a barreira física da epiderme é transgredida, é produzida a resposta imune inata coordenada pelas células de defesa que produzem HPDs com objetivo de eliminar os microrganismos. Esta resposta é mediada inicialmente pelos queratinócitos, cujos receptores de patógenos podem detectar os antígenos, iniciando uma coordenada reação inflamatória, que inclui o recrutamento de células brancas e a produção de peptídeos tais como as  $\beta$ -defensas (Leonard et al., 2012).

Estas  $\beta$ -defensas tem funções nas camadas do sistema tegumentário que dependem de variáveis, como inflamação, idade e raça do cão (Van Damme et al., 2009). O presente trabalho revelou que houve produção leucocitária de  $\beta$ -defensas dérmicas nos casos de LVC a espécie canina. No entanto, devido à limitada informação obtida nas histórias clínicas, não foi possível realizar correlações de expressão de defensas, cor de pelagem e sexo dos pacientes, tendo em conta que os animais machos segundo a literatura possuem maior quantidade de defesa cBD103 para a sua diferenciação reprodutiva (Candille et al., 2007).

A significativa marcação das  $\beta$ -defensas (cBD103 e cBD102) na pele de cães acometidos por leishmaniose visceral canina LVC, encontrada no presente estudo corrobora os resultados descritos por Linde et al., (2008), que descreveram a grande interação entre os invasores patógenos e peptídeos de defesa da pele.

Outros autores também descrevem a presença destes peptídeos tanto em animais doentes quanto em sadios (Van Damme et al., 2009; Candille et al., 2007 e Ganz, 1999).

Devido à ampla e notável expressão de extensão e intensidade das  $\beta$ -defensas é possível afirmar que esses peptídeos sejam comumente encontrados na pele de cães, (Chrudimská et al., 2010).

Foi confirmada a presença das  $\beta$ -defensinas na epiderme nos três grupos estudados, porém a expressão da extensão da cBD-103 foi maior do que a cBD-102, isto demonstra que há significativa presença da cBD-103 na epiderme e anexos epidérmicos (foliculo piloso e glândula sebácea) evidenciando elevada afinidade e homologia com a hBD-3, fato esse já comprovado anteriormente (Van Damme et al.,2009).

Mesmo com menor extensão epidérmica da cBD-102 em relação a cBD-103 no presente estudo evidenciou-se a homologia entre a hBD-2 com a cBD-102 nos três grupos estudados, contrariando os achados de Van Damme et al.(2009) que utilizaram a técnica de PCR.

A análise dos peptídeos epidérmicos não foi o objetivo central desse trabalho, uma vez que a dermatite na LVC é doença tipicamente dérmica. Mas com o importante papel dos queratinócitos na imunologia da pele, poderia causar surpresa ou curiosidade se algum dos grupos expressasse diferentemente as  $\beta$ -defensinas.

Devido à ausência de diferença na expressão da extensão das  $\beta$ -defensinas na epiderme dos animais dos grupos DD e DU, é provável considerar que esses peptídeos, nessa região não tenham participação efetiva na imunidade da LVC. A maior expressão da cBD103 provavelmente ocorreu devido a maior expressão dessa  $\beta$ -defensina na pele canina, pois não houve diferença do grupo controle. No entanto maior intensidade de imunomarcção no grupo controle pode surgir de algum mecanismo de “down regulation” na produção epidérmica desses peptídeos.

Nas células inflamatórias da derme também foi evidenciada a presença das duas  $\beta$ -defensinas (cBD102 e cBD103), concordando prévios relatos (Bogefors et al., 2012). Na presente investigação não houve, para cada defensina, diferença entre os grupos (DD e DU), tanto em relação a extensão como a intensidade, mas cBD103 foi mais expressa que cBD102. Nossa conclusão é semelhante ao descrito para a epiderme. Considerando que os cães com a forma DD sejam em tese, mais resistentes à doença do que os DU (Vesely et al., 2012, Papadogiannakis et al., 2005), a ausência de diferença entre os grupos aponta para pouca participação das  $\beta$ -defensinas no controle da doença, também considerando que uma vez sintomáticos esses animais não se recuperam espontaneamente. Corroborando essa assertiva foi a falta de correlação entre a expressão das duas  $\beta$ -defensinas com a carga parasitária em ambos os grupos (DD e DU). Entre tanto, fica a dúvida que se eventualmente esses animais produzissem mais cBD102 a evolução clínica poderia ser diferente. A

avaliação da expressão das  $\beta$ -defensinas e a sua correlação com a expressão fenotípica dos leucócitos envolvidos no processo inflamatório poderiam fornecer maior entendimento na inter-relação imunológica envolvida na patogênese da LVC.

Comparação de estudos *in-vitro* e *in-vivo* da atividade anti-leishmania das  $\beta$ -defensinas, são necessários para ajudar a estabelecer diferenças como o crescimento e multiplicação do microrganismo e assim aportar baseado no seu comportamento hipóteses para o seu controle (Ganz, 2002).

São inúmeros os patógenos que estimulam o sistema imunológico, no caso dos intracelulares, exigem mais astúcia e proteínas mais “especializadas” por parte do sistema de defesas do hospedeiro. As defensinas são consideradas como substâncias teciduais, produzidas principalmente pelas células mononucleares de sangue periféricas (PMBCs), quando há inflamação por infecções ou parasitas tais como LVC (Selsted, 2005).

Interessante é a conhecida resistência da raça Ibizaian hound contra a leishmaniose mediada por respostas celulares fortes contra o parasito com citocinas como a IL-12 e IFN- $\gamma$  relacionadas com o retardamento da LVC e até involução da doença (Solano-Gallego et al., 2000; Salvador-Marques, 2007; Tizard, 2009).

Comparação entre as expressões das defensinas nessa raça poderia fornecer também melhor entendimento no papel desses peptídeos frente à LVC e poderiam estabelecer resultados práticos para o desenvolvimento de novas estratégias no controle da mesma.

## 9. CONCLUSÕES

Foi possível a padronização da técnica de imunistoquímica usando como anticorpos primários as  $\beta$ -defensinas hBD-2 e hBD-3 confirmando-se a sua homologia.

Foi demonstrada a produção das  $\beta$ -defensinas na pele de cães acometidos pela LVC.

A  $\beta$ -defensina cBD-103 foi o peptídeo mais expresso na extensão e na intensidade na pele de cães acometidos pela LVC.

Não houve diferenças nas expressões das  $\beta$ -defensinas quando estudadas separadamente nos grupos DD e DU.

Não se observou correlação da expressão das B defensinas com a carga parasitária na pele dos cães acometidos pela LVC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTCHEVA, N.; ZELEZETSKY, I.; TOSSI, A. Cationic Antimicrobial Peptides-The defensins. (Ed.) **Handbook of Biologically Active Peptides**. ed. Elsevier, 2006. p. 55-65.
- ASANO, S.; ICHIKAWA, Y.; KUMANGAI, T.; KAWASHIMA, H.; IMOKAWA, G. Microanalysis of an antimicrobial peptide,  $\beta$ -defensin-2, in the stratum corneum from patients with atopic dermatitis. **Journal Clinical and Laboratory Investigations**, v. 10, p.97-104, 2008.
- AUVYNET, C.; and ROSENSTEIN, Y. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides the small yet big players in innate and adaptive immunity. **Journal The FEBS**. v.275, p.6497-6508, 2009.
- BALEEIRO, C.O.; PARANHOS-SILVA, M.; SANTOS, J.C.; OLIVEIRA, G.G.S.; NASCIMENTO, E.G.; CARVALHO, L.P.; SANTOS, W.L.C. Montenegro's skin reactions and antibodies against different Leishmania species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. **Journal Veterinary parasitology**. v.139, p.21-28, 2006.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.F. Canine leishmaniasis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Review. **Journal Cell Press**, v.24, n.7, p.324-330, 2008.
- BOGEFORS, J.; KVARNHAMMAR, M.A.; HOCKERFELTI, U.; CARDELL, L.O. Reduced tonsillar expression of human  $\beta$ -defensins 1,2 and 3 in allergic rhinitis. **Journal Federation of European Microbiological Societies**. 2012. doi: 10.1111/j.1574-695X. (in print).
- BRASIL. Ministério da Saúde 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003. ISBN 85-334-0742-4.

- CANDILLE, S.I.; KAELIN, CH.B.; CATTANACH, B.M.; YU, B.; THOMPSON, D.A.; NIX, M.A.; KERNS, J.A.; SCHMUTZ, S.M.; MILLHAUSER, G.L.; BARSH, G.S.A.  $\beta$ -defensin Mutation Causes Black Coat Color in Domestic Dogs. **Journal Research Articles Science**, v.318, p.1418-1423, 2007.
- CHRUDIMSKÁ, T.; CHRUDIMSKÝ, T.; GOLOVCHENKO, M.; RUDENKO, N.; GRUBHOFFER, L. New defensins from hard and soft ticks: Similarities, differences, and phylogenetic analyses. **Journal Veterinary Parasitology**, v.167, p.298-303, 2010.
- CROVELLA, S.; ANTCHEVA, N.; ZELEZETSKY, I.; BONIOTTO, M.; PACOR, SABRINA.; VERGA, M.V.; FALZACAPPA AND TOSSI, A.; Primate  $\beta$ -defensins-Structure, Function and Evolution. **Journal Current Protein and peptide Science**, v.6, p.7-21, 2005.
- DIAO, H.; GUO, CH.; LIN, D.; ZHANG, Y. Intein-mediated is an effective approach in the study of  $\beta$ -defensins. **Journal Biochemical and Biophysical research Communications**, v.357, p.840-846, 2007.
- ENGWERDA, C.R.; ATO, M.; KAYE, P.M.; Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Review. **Journal Immunoparasitology Series**, v.20, n.11, 2004.
- ERLES, K.; BROWNLIE, J. Expression of  $\beta$ -defensins in the canine respiratory tract and antimicrobial activity against *Bordetella bronchiseptica*. **Journal Veterinary Immunology and Immunopatology**, v.135, p.12-19, 2010.
- GANZ, TOMAS. Defensins and host defense. **Journal Perspectives: Immunology**. v.15, p.420-421, 1999.
- GANZ, TOMAS. Versatiles defensins. **Journal Perspectives: Immunology**. v.298, p.978-979, 2002.
- HILL, C.P.; YEE, J.; SELSTED, M.E.; EISENBERG, T.D. Cristal Structure of Defensin HNP-3, na Amphiphilic Dimer: Mechanisms of Membrane Permeabilization. **Journal Molecular Biology Institute and Departamento f Chemistry and Biochemistry**, v.251, p.1481-1485, 1991.
- LATZ, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. **Journal Current opinion in Immunology**, v.22, p.2228-33, 2010.

- LEONARD, B.C.; AFFOLTER, V.K.; BEVINS, CH.L. Antimicrobial peptides: agentes of border protection for companion animals. **Journal Veterinary Dermatology**, v.23, p.177-186, 2012.
- LINDE, A.; ROSS, C.R.; DAVIS, E.G.; DIB, F.; BLECHA.; MELAGREJO, T. Innate Immunity and Host Defense Peptides in Veterinary Medicine. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v.22, pag.247-265, 2008.
- LYNN, D.J.; BRADLEY, D.G; Discovery of  $\alpha$ -defensins in basal mammals. **Journal Developmental and Comparative Immunology**, v.31, p.963–967. 2010.
- MCGWIRE, B.S and KULKARNI, M.M. Interactions of antimicrobial peptides with *leishmania* and *trypanosomes* and their functional role in host parasitism. **Journal Experimental Parasitology**. v.126, p.397- 405, 2010.
- NOGUEIRA, J.L.; MENDES, M.V.; PASSOS, C.C.; AMBROSIO, C.E. [2009]. A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde pública: uma zoonose reemergente. Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, available at: < <http://www.revista.inf.br/veterinaria13/artigos/artigos.htm>> Acessado em: Junho 06, 2011.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Revisão. **Journal Vaccine**, v.26, p.1709-1724, 2008.
- PAPADOGIANNAKIS, E.I.; KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, J.V.; LEKKAS, S.; KARAMERIS, A.; FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Journal Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.104, p.227-237, 2005.
- PINHO, M.S.L.; GHISLANDI, L.; FRONZA, H.JR.; WENGERKIEWICZ, A.; FILHO, A.P.; FERREIRA, L.C.; KLEINUBING, H.JR.; FERREIRA, L.E. Valor prognóstico da expressão da proteína Survivina em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico no Câncer Colorretal. **Revista Brasileira Coloproct**, v. 25, n.2, p.121-127, 2005.
- ROCK, K.L.; LATZ, E.; ONTIVEROS, F.; KONO, H.; The Sterile Inflammatory Response. Review. **Journal Annual of Immunology**, v.28, p.321-42, 2010.
- RODRIGUEZ-JIMENEZ, F.J.; KRAUSE, A.; SCHULZ, S.; FORSSMANN, W.G.; CONEJO-GARCIA, J.R.; SCHREEB, R.; MOTZKUS, D. Distribution of new human-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. **Journal Genomics**. v.81, p.175-183, 2003.

- ROSYPAL, A.C.; CORTES-VECINO, J.A.; GENNARI, S.M.; DUBEY, R.R.; LINDSAY, D.S. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dog from urban aéreas of Brazil and Colombia. **Journal Veterinary parasitology**. v.149, p.172-177, 2007.
- SALVADOR-MARQUES, P. [2005-2007] Notas de Diagnóstico, Patologia Tegumentar e Patoimunologia da Leishmaniose Canina. **Course- E.S.A.V.S. Veterinary Dermatology**, available at: < <http://leishmaniosecanina.blogspot.com> > acessado em: Outubro 20, 2011.
- SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; ALBEROLA, J.; RODRIGUEZ-CORTE'S, A.; OJEDA, A.; LO'PEZ-FUERTES, L.; TIMON, M., SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. Longitudinal analysis of Ccitokyne gene expression. And parasite load in PMBC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Journal Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.125, p.168-175, 2008.
- SELSTED, M.E.; OUELLETE, A.J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. Review. **Journal Nature Immunology**. v.6, n.6. p.551-557, 2005.
- SILVA, FRANCINLDO. S., Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v.1, n.1, p.20, 2007.
- SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presentes a predominantly celular immune response against natural *Leishmania* infection. **Journal Veterinary Parasitology**. v. 90, p.37-45, 2000.
- SUN, L.; FINNEGAN, M. C.; KISH-CATALONE, T.; BLUMENTHAL, R.; GARZINO-DEMO, P.; LA TERRA MAGGIORE, G.M.; BERRONE, S.; KLEINMAN, C.; WU, Z.; ABDELWAHAB, S.; LU, W.; GARZINO-DEMO, A. Human-Defensins Suppres Human Immunodeficiency Virus Infection: Potential Role in Mucosal Protetion. **Journal of Virology**. v.79, n.22, p.14318-14329, 2005.
- STEINSTRÆSSER, L.; KRANEBURG, U.; JACOBSEN, F.; AL-BENNA, S. Hot defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. Review. **Journal Immunobiology**. v.216, p.322-333, 2011.
- TIZARD, IAN.R. Immunity to parasites. (Ed). **Veterinary imunology na introduction**. 5.ed. Roca: Ltda. 2000.
- TIZARD, IAN.R. Citokines and the immune system. (Ed). **Veterinary Immunology** 8.ed. Elseiver: Ltda. 2009.
- VAN-DAMME, M.M.C.; WILLEMSE, T.; DIJK, A.V.; HAAGSMAN, H.P.; VELDHUIZEN, E.J.A. Altered cutaneous expression of  $\beta$ -defensins dog with atopic dermatitis. **Journal Molecular immunology**, v.46, p.2449-2455. 2009.

VESELY, M.C.A.; BERMEJO, D.A.; MONTES, C.L.; ACOSTA-RODRIGUEZ, E.V.; GRUPPI, A. B-Cell Response during Protozoan Parasite Infections. **Journal of Parasitology Research**. v.149, p.1-8, 2012.

YANG, D.; CHERTOV, O.; BYKOVSKAIA, N.; CHEN, Q.; BUFFO, M.J.; SHOGAN, J.; ANDERSON, M.; SCHODER, J.M.; WANG, J.M.; HOWARD, O.M.Z.; OPPENHEIM, J.J.  $\beta$ -Defensins: Linking Innate and adaptative Immunity Through Dendritic and T Cell CCR6. **Journal Reports Science**, v.286, p.525-526, 1999.

YOUNT, N.Y.; KUPFERWASSER, D.; SPISNI, A.; DUTZ, S.M.; RAMJAN, Z.H.; SHARMA, S.; WARING, A.J.; YEAMAN, M.R. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-102 and crostamine. **Journal Sciencesteage**. v.106, n.35, p.14972-14977, 2009.

## ABREVIATURAS

**AMPs:** peptídeos antimicrobianos

**cBD:** beta defensina canina

**DD:** dermatite descamativa

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DU:** dermatite ulcerativa

**hBD:** beta defensina humana

**HE:** hematoxilina e eosina

**HPDs:** host defense peptides (peptídeos de defesa do hospedeiro)

**IFN:** interferon

**Ig:** imunoglobulina

**IHQ:** imunoistoquímica

**IL:** interleucina

**IPI:** imunoperoxidase indireta

**LVC:** leishmaniose visceral canina

**MHC:** major histocompatibility protein (complexo de histocompatibilidade principal)

**NK:** célula *natural killer*

**NO:** óxido nítrico

**PAMPs:** pathogen-associated molecular pattern (padrão molecular associado a patógenos)

**PMBCs:** peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares de sangue periférico)

**Th, célula:** linfócitos T auxiliar (helper)

**TNF:** fator de necrose tumoral

**TNF:** tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)

**α:** alfa

**β:** beta

**γ:** gama

**θ:** teta