

FERDINAN ALMEIDA MELO

**ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR NA PELE DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE INFECTADOS**

Tese 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
2005

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

T

M528a
2005

Melo, Ferdinan Almeida, 1976-

Alterações da matriz extracelular na pele de cães
com leishmaniose visceral naturalmente infectados /
Ferdinan Almeida Melo. – Viçosa : UFV, 2005.
xvi, 75f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vitoria
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 59-75

1. Cão - Doenças. 2. Matriz extracelular.
3. Leishmaniose visceral. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.70896

FERDINAN ALMEIDA MELO

**ALTERAÇÕES DA MATRIZ EXTRACELULAR NA PELE DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE INFECTADOS**

Tese 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: 03 de fevereiro de 2005

Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo
(Conselheiro)

Prof. Cláudio César Fonseca
(Conselheiro)

Profa. Ana Lúcia Abreu Silva

Prof. Paula Dias Bevilacqua

Profa. Marlene Isabel Vargas Viloria
(Orientadora)

*A Deus,
Aos meus pais: Domingos e Zulmira,
Aos meus irmãos.
Pelo amor e incentivo a mim sempre dados.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, a verdadeira razão, minha fortaleza.

Aos meus pais Domingos Carlos Melo e Zulmira Almeida Melo pelo infinito amor, apoio e compreensão.

Aos meus irmãos Darcy, Reginaldo, Denise, Domingos, Carlos Augusto, Denilde, Lenilde, Edvaldo e Nilma pelo apoio e incentivo.

Aos meus sobrinhos Mateus, Juninho, Kevin, Mariana, Denis e Sofia por tornarem nossos dias mais felizes.

À Universidade Estadual do Maranhão/UEMA e Universidade Federal de Viçosa/UFV pela oportunidade de aperfeiçoamento.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilorio, sou eternamente grato pela sua orientação, pelos seus ensinamentos profissionais e de vida, por nos receber como uma mãe e, pela sua valiosa amizade.

A professora Ana Lúcia Abreu Silva pela orientação de sempre, pelas valiosas sugestões e grande colaboração na realização deste trabalho, pelo incentivo à pesquisa, além de tudo, pela amizade inestimável construída.

Ao professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, pela amizade e pelos seus ensinamentos que nos ajuda a ver novos horizontes de pesquisas.

Ao professor José Gomes Pereira pela amizade, confiança e pelo apoio desde o período de iniciação científica.

Ao professor Cláudio Fonseca pela amizade, pelas sugestões e colaboração neste trabalho.

Ao professor Eduardo Paulino pela atenção e sugestões sobre a estatística.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFV.

À Rosi, incansável secretária do curso de pós-graduação, obrigado pela amizade, apoio e pela atenção que dedica a cada um de nós pós-graduando.

À Fundação Osvaldo Cruz/Fiocruz-RJ

Aos amigos da Fiocruz prof. Dr. Sylvio Celso, Dra. Kátia Calabrese, Dra. Celeste Sousa, Dra. Tânia Zaverucha, Luís Otávio pela amizade e pela grandiosa contribuição para realização deste trabalho.

Ao senhor Arlindo Caldeira da Rocha (*in memoriam*) pelo apoio nesta pesquisa, pela dedicação com que fazia seu trabalho.

À Flávia Cardoso e sua família, pela amizade ímpar e pela grande colaboração e suporte para realização deste trabalho.

À Themis di Paula pelo apoio e por fazer parte da minha vida.

Aos professores da Universidade Estadual do Maranhão Porfírio Guerra, Rita Guerra, Lúcia Alves, Maria Inez, Hamilton Santos, Socorro Oliveira pelo apoio e incentivo de sempre.

À Priscilla, pela grande amizade.

Aos amigos Luis, Rafael e Leandro pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e colegas de mestrado Larissa, Sidimar, Carol, Carlos, Breno, Daniel, Policarpo e Claudia pelos momentos únicos que passamos juntos.

A Irma Ximena.

Aos amigos Patrícia, Cíntia, Lúcia, Érika, Jéferson pelos bons momentos.

À Lisa, Ana Paula, Fabio Moraes, Paulo Ricardo, e agora Fabrício e Ana Paula Timóteo, meus irmãos de mestrado, pela amizade e pela vontade de aprender cada vez mais.

Aos amigos de graduação e da vida inteira Vivian, Fernando, Hélio, Sebastião, Modesto e os demais por compartilharem dessa etapa da minha vida.

Ao Lívio, Árina, Fabiola, Patrícia, Alcina, Torres, Talmir, grandes amizades.

À Katiene, Aguida, Leonardo, Aline, Kris pela torcida e pela amizade.

Aos funcionários do DVT: Adão, Cláudio, Heloísa, Bel, Geraldinho e Margarete.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desta pesquisa.

BIOGRAFIA

FERDINAN ALMEIDA MELO, filho de Domingos Carlos Melo e Zulmira Almeida Melo, nascido em 27 de novembro de 1976, na cidade de São Luís - Maranhão-Brasil.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão em agosto de 1996, concluindo sua graduação em junho do ano de 2003. Durante este período participou do Programa de Institucional de Bolsas de Iniciação Científica/PIBIC/CNPq durante dois anos.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2003.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. O parasita leishmania	4
3.2. As leishmanioses.....	6
3.2.1. Imunopatologia das leishmanioses.....	7
3.3. A Leishmaniose Visceral (LV).....	8
3.3.1. Patologia da leishmaniose visceral	9
3.3.2. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral.....	10
3.4. O Envolvimento do cão (<i>Canis familiares</i>)	11
3.5. A pele.....	12
3.6. As alterações da Matriz Extracelular (MEC).....	13
3.6.1. O Sistema Colágeno.....	14
3.6.2. O Sistema Elástico.....	17

3.6.3. Fibronectina (FN).....	18
3.6.4. Laminina (LN).....	20
3.7. Uso da imunohistoquímica em biópsias de pele como ferramenta diagnóstica em leishmanioses.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Animais	22
4.1.1. Escolha dos cães	22
4.2. Distribuição dos grupos.....	23
4.3. Obtenção das amostras de sangue dos animais.....	26
4.4. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	26
4.5. Detecção de IgGs anti- <i>Leishmania</i> por ELISA.....	27
4.6. A biopsia de pele.....	28
4.7. Análises histológicas.....	28
4.7.1. Análises histoquímicas do Sistema Colágeno.....	29
4.7.2. Análises histoquímicas do Sistema Elástico.....	30
4.8. Análises imunohistoquímicas.....	31
4.8.1. Imunoperoxidase Indireta para detecção do parasita <i>in situ</i>	31
4.8.2. Imohistoquímica para Fibronectina, Laminina e <i>Leshmania</i>	32
4.9. Análises estatísticas.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Avaliação clínica	34
5.2. Resposta humoral x avaliação clínica.....	37
5.3. Histopatologia.....	40
5.4. Detecção de <i>Leishmania in situ</i> pela técnica de imunoperoxidase indireta em pele incluída em parafina.....	43
5.5. Alterações da Matriz Extracelular.....	45
6. CONCLUSÕES.....	57
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS

- Acm- Anticorpo monoclonal
- ATPase- Adenina Trifosfatase
- CCZ- Centro de Controle de Zoonoses
- C3- Complemento 3 (CD11b / CD18)
- C3b- Componente 3b do complemento
- CR1- Receptor do complemento 1
- Célula NK- Célula *Natural Killer*
- CD- Cluster differentiation
- CD4- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares/indutores
- CD8- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores
- DTH- Delayed-type hypersensitivity (Hipersensibilidade Retardada)
- ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay
- FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz-RJ
- FITC- Isotiocianato de fluoresceína
- FN- Fibronectina
- GAG- Glicosaminoglicana
- Gp63- Glicoproteína com 63 Kilodaltons
- G I- Grupo I (cães sintomáticos com lesões cutâneas)
- G II- grupo II (cães oligosintomáticos com lesões cutâneas)
- G III- Cães não infectados
- IFN γ - Interferon Gama

IgG- Imunoglobulina da classe G
IL-2, 4, 5, 6, 7, 8, 10- Interleucina-2, 4, 5, 6, 7, 8, 10
LBHC- laboratório de Biologia e Controle de hematozoários
LC- Leishmaniose canina
LFA- Função linfóide associada ao antígeno (CD 11 e CD18)
LV- Leishmaniose visceral
LVC- Leishmaniose visceral canina
LN- Laminina
LPS- Lipopolissacarídeo
LPG- Lipofosfoglicano
Mac-1- Antígeno macrófago 1
MEC- Matriz extracelular
NO- Óxido Nítrico
OCT- Tissue Teck- meio de congelamento para material de biopsia
PBS- Tampão fosfato salino
PGN- PBS+gelatina+azida em pó
pH- Potencial hidrogeniônico
RIFI- Reação de Imunofluorescência Indireta
SR- Sirius Red/ Direct Red 80
SRD- Sem raça definida
SMF- Sistema Monocítico Fagocitário
Th1- Células TCD4+ secretoras do padrão 1 de citocinas (IL-2, IFN- γ)
Th2- Células TCD4+ secretoras do padrão 2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10)
TNF- α , β - Fator de Necrose Tumoral- α , β
TMB- Tiaminobenzidina
UFV- Universidade Federal de Viçosa
°C- Graus Celsius
 μ L- microlitro

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> , do grupo I, sintomáticos. Sinais clínicos acentuados de leishmaniose: emagrecimento, alopecia generalizada, lesões generalizadas.....	24
Figura 2. Cães naturalmente infectados com <i>L. chagasi</i> , do grupo II, oligossintomáticos. Sinais clínicos moderados de leishmaniose: úlceras e áreas de alopecia localizada.....	25
Figura 3. Pele de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> . A - Pele de cão sintomático do grupo I apresentando intenso infiltrado inflamatório (seta), 260X; B- Presença de formas amastigotas do parasita no interior de macrófagos (seta), 460X; C - Pele de cão oligossintomático do grupo II com infiltrado inflamatório (seta), 420X; D- Presença de parasitas em menor intensidade, 460X, Coloração H&E.....	42
Figura 4. Pele de cão do grupo III, não infectado (A); B- pele de cão do grupo I, cão sintomático, mostrando a detecção de amastigotas de <i>Leishmania</i> dentro de macrófagos, Imunoperoxidase indireta, 200X.....	44
Figura 5. A- Pele de cão não infectado, grupo III, apresentando predominância de fibras colágenas fortemente birrefringentes (colágeno tipo I), marcado em vermelho. B e C- Pele de cão sintomático do grupo I apresentando predominância de fibras colágenas do tipo III, menos birrefringentes, marcadas em verde. D- Pele de cão oligossintomático do grupo II, mostrando a presença de fibras colágenas tanto do tipo I (em vermelho) quanto do tipo III (em verde) . Sírius Red, sob luz polarizada, 450X.....	49

- Figura 6.** A- Pele de cão não infectado, grupo III, apresentando padrão de fibras reticulares normalmente distribuídas na derme. B e C- Pele de cão sintomático do grupo I, fibras reticulares distribuídas desuniformemente, em maior quantidade. D- Pele de cão oligosintomático do grupo II, fibras reticulares desuniformes e, em menor quantidade. Reticulina de Gordon and Sweets, 440X..... 50
- Figura 7.** A- Pele de cão do grupo III, não infectado apresentando fibras elásticas em padrão normal (seta), 460X. B e C- Pele de cão oligossintomático do grupo II, fibras elásticas apresentando padrão de normalidade com discreto espessamento (seta), 460X. D- Pele de cão sintomático do grupo I, fibras elásticas distribuídas irregularmente, apresentando espessamento evidente (seta), 430X. Verhoeff..... 52
- Figura 8.** Análises em microscopia confocal. A - Fibronectina normal em pele de cão do grupo controle negativo (GIII). B - Diminuição de fibronectina em pele de cão do grupo I (em verde, FITC). C - Parasitas marcados com CY-3 em vermelho, em pele de cão do grupo I do mesmo corte apresentado em B..... 54
- Figura 9.** Análises em microscopia confocal. A - Laminina normal em pele de cão do grupo controle negativo (GIII). B - Diminuição de laminina em pele de cão do grupo I (em verde, FITC)..... 56

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Sinais clínicos percentuais observados e utilizados para classificação dos cães em sintomáticos (GI), oligossintomáticos (GII) e não infectados (GIII) na cidade de São Luis-MA.....	35
Tabela 2. Reatividade sorológica de IgG em soros dos cães naturalmente infectados dos grupos I, II e III.....	37
Tabela 3. Valores percentuais médios do colágeno do tipo III observado na pele dos cães dos grupos I, II e III através da técnica histoquímica Sirius Red sob luz polarizada.....	47

RESUMO

MELO, Ferdinan Almeida Melo, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Viloria. Conselheiros: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e Cláudio César Fonseca.

O objetivo deste estudo foi investigar as alterações da matriz extracelular em pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. Foram selecionados 40 cães naturalmente infectados com *L. chagasi* provenientes de São Luís-MA, agrupados de acordo com a sintomatologia clínica: 20 cães sintomáticos com lesões cutâneas (Grupo I), 20 oligossintomáticos com lesões cutâneas (grupo II) com sorologia positiva para *Leishmania* pela RIFI e por ELISA e 20 cães sorologicamente negativos para leishmaniose (grupo III), não infectados. Foram realizadas biopsias de pele para análises das alterações histológicas através da técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), análises do sistema colágeno pela técnica Picrus Sirius Red e Reticulina de Gordon & Sweets. O sistema elástico foi avaliado pela técnica de Verhoeff. Utilizou-se a Imunoperoxidase Indireta para detecção de *Leishmania* no tecido cutâneo. As fibras adesivas fibronectina (FN) e laminina (LN) foram detectadas através da técnica de imunohistoquímica com o uso dos anticorpos monoclonais anti-fibronectina e anti-laminina, respectivamente. As médias da reatividade sorológica dos animais medida pelo ELISA foram: $0,44 \pm 0,21$, para o grupo I; $0,23 \pm 0,08$ para o grupo II e $0,037 \pm 0,007$, grupo III, com cut-off=0,09, resultados estatisticamente significativos. As maiores frequências de sinais clínicos apresentados pelos cães do grupo I e II foram: emagrecimento, alopecia generalizada, dermatite furfurácea, úlceras localizadas e generalizadas, pelagem opaca e onicogribose, sendo que estes sinais clínicos têm sido

alvos de grandes discussões na literatura, observados tanto em infecções naturais como em experimentais. As alterações histológicas observadas na pele dos cães dos grupos I e II foram hiperqueratose que variava de acentuada a discreta, acantose geralmente acentuada, vacuolização da camada basal. Na derme observou-se um infiltrado inflamatório difuso constituído principalmente por neutrófilos, linfócitos, macrófagos e em alguns casos, mastócitos associados à presença do parasita. Comprovou-se a predominância do colágeno do tipo III na pele dos cães do grupo I ($79,5 \pm 10,0$), enquanto nos animais do grupo II os colágenos do tipo I e do tipo III foram observados em proporções variáveis, resultados considerados estatisticamente significativos. A presença do colágeno do tipo III foi confirmada pela técnica da Reticulina de Gordon & Sweets. As fibras elásticas dos grupos I e II apresentavam-se mais desuniformes e espessas quando comparadas as do grupo III. A expressão da fibronectina e da laminina foi reduzida na pele dos animais infectados, estando associada à presença de parasitas. Estes resultados demonstram a intensa degradação dos constituintes da MEC da pele causadas por *Leishmania*.

ABSTRACT

MELO, Ferdinan Almeida, M. S., Universidade Federal de Viçosa, february of 2005. **Extracellular matrix alterations in skin of dogs with visceral leishmaniasis naturally infected.** Advisor: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Committee members: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo and Cláudio César Fonseca.

The objective of this study was to investigate the extracellular matrix changes in skin of dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. Fourty dogs were selected naturally infected with *L. chagasi* come from São Luis-MA, contained in agreement with the clinical symptoms, 20 symptomatic dogs with cutaneous lesions (group I), 20 oligosymptomatic with cutaneous lesions (group II) with positive serologically for *Leishmania* by Indirect Immunofluorescence Assay (IFAT) and by enzyme-linked immunosorbence assay (ELISA), and 20 dogs negative for leishmaniasis (group III), dogs not infected. Skin biopsies were accomplished for analyses of the histological alterations by technique of Hematoxylin and Eosin (HE), analyses of the collagen system for technical Picrus Sirius Red and Reticulin of Gordon & Sweets. The elastic system was evaluated by the technique of Verhoeff. Indirect Immunoperoxidase for detection of *Leishmania* in the cutaneous tissue. The fibers adhesive fibronectin (FN) and laminin (LN) they were detected by immunohistochemical technique with the use of the monoclonal antibodies anti-fibronectin and anti-laminin, respectively. The averages of the reactivity serological of the animals measure for ELISA were: $0,44 \pm 0,21$, for the group I; $0,23 \pm 0,08$ for the group II and $0,037 \pm 0,007$, group III, with cut-off=0,09, results were significant statistically. The largest frequencies of clinical signs presented by the dogs of the group I and II were: weight loss, generalized alopecia, dermatitis, located and widespread ulcers, opaque coat and onychogryphosis, clinical

signs have been objectives of great discussions in the literature, observed so much in natural infections as in experimental. The histological alterations observed in the skin of the dogs of the groups I and II were hiperqueratose that varied of accentuated at discreet, acantosys generally accentuated, vacuolization of the basal membrane. In the derme it was observed an infiltrated inflammatory diffuse constituted mainly by neutrophils, lynphocytes, macrophages and in some cases, mast cell associated to the presence of the parasite. It was proven the prevalence of the collagen of the type III in the skin of the dogs of the group I ($79,5 \pm 10,0$), while in the animals of the group II the collagens of the type I and of the type III was observed in variable proportions, results considered statistically significant. The presence of the collagen of the type III was confirmed by the technique of Reticulin of Gordon & Sweets. The elastic fibers of the groups I and II seemed more disforms and thicken when compared the one of the group III. The expression of the fibronectin and of the laminin it was reduced in the skin of the infected animals, being associated to the presence of parasites. These results demonstrate the intense degradation of the extracelular matrix in the skin caused by *Leishmania*.

1 - INTRODUÇÃO

A implantação de grandes projetos agropecuários, parques industriais, usinas hidrelétricas, conjuntos habitacionais e construção de ferrovias e rodovias, determinou em grande parte certo desequilíbrio ecológico em várias regiões, propiciando uma adaptação de vetores e reservatórios ao ambiente domiciliar ou peridomiciliar. Como consequência o homem passou a ser um hospedeiro acidental de vários agentes que até então estavam restritos ao ambiente silvestre, podendo ser citado dentre eles as leishmanioses (MENDES et al., 2002).

Estima-se que a população mundial exposta ao risco de adquirir a doença seja de 350 milhões de indivíduos e que aproximadamente 12 a 14 milhões de pessoas estejam infectadas (DESJEUX, 1992; WHO, 2000). A Organização Mundial de Saúde prevê uma incidência anual da infecção ou doença em torno de 1 a 1,5 milhões, com 500.000 novos casos para Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Cutânea, respectivamente (WHO, 2000). No Brasil, a grande migração observada nas últimas décadas e descontinuidade dos programas de controle e combate aos vetores das grandes endemias favoreceu o ressurgimento das leishmanioses em várias cidades (ASHFORD, 2000).

No Brasil, a leishmaniose visceral ocorre de forma endêmica em vários estados, porém o maior número de casos concentra-se na região Nordeste, principalmente, nos estados do Piauí, Maranhão, Ceará e Bahia onde foram registrados 94% dos casos desde o início da década de 80 (FUNASA, 1999). Atualmente várias cidades como Belo Horizonte-MG; Rio de Janeiro-RJ, Salvador-BA, Teresina-PI, São Luís-MA, dentre outras, enfrentam epidemia da doença com crescentes relatos de urbanização das leishmanioses deixando esta de ser considerada doença de caráter rural. A maior preocupação e gravidade encontram-se na possibilidade de cães

assintomáticos servirem de reservatório da doença, pondo em risco indivíduos que estão ao seu redor.

Dentre as grandes endemias transmitidas por insetos, que afetam o estado do Maranhão estão as leishmanioses, nas suas diversas formas, constituindo-se um crescente problema de saúde pública (LAINSON & SHAW, 1992).

O Estado do Maranhão constituído de 217 municípios vem apresentando índices alarmantes de leishmaniose visceral humana e canina, destacando-se o município de São Luís, que desde 1982 apresenta-se como uma área de maior endemia no Estado (COSTA et al., 1995). Atualmente é considerado como área hiperendêmica de leishmanioses e a cada ano tem-se constatado aumento da casuística das formas cutânea e visceral da doença, (FUNASA, 1999).

A maioria das informações sobre o mecanismo regulatório que culmina resistência ou susceptibilidade a leishmaniose têm sido feito através de reprodução da doença em camundongos (LOCKESLEY & LOUIS, 1992). Na leishmaniose humana, entretanto, alguns parâmetros como o meio ambiente ou a rota de infecção pode ser importante para o entendimento dessa doença (KEMP et al., 1996). Tentativas de superar as condições experimentais através do estudo do hospedeiro natural da leishmaniose têm sido feitas (PINELLI et al., 1994). Um deste modelo é o cão.

Apesar da pele do cão ser a principal fonte de infecção para o vetor ainda não há estudos similares na leishmaniose visceral canina (LVC), o que julgamos ser de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas que investiguem a interação entre o parasita e a matriz extracelular com vistas a identificar alterações dos componentes da matriz (colágenos I a III, fibras elásticas, eulanínicas e oxitalânicas) presentes no infiltrado inflamatório da derme, bem como padrão de organização da matriz do tecido conjuntivo cicatricial. Se de fato ocorre alteração da matriz extracelular na infecção canina, e se esta contribui para a retenção e posterior disseminação do parasita para os órgãos do sistema mononuclear fagocítico e provavelmente seja um dos fatores mais importantes na patogênese da LVC.

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar as alterações da matriz extracelular em pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.

2.2. Objetivos específicos

- Diferenciar clinicamente os tipos de lesões cutâneas apresentadas pelos cães naturalmente infectados com diferentes sinais clínicos de leishmaniose canina;
- Caracterizar histologicamente o infiltrado inflamatório da leishmaniose visceral canina (LVC) nas diferentes formas clínicas;
- Detectar *Leishmania in situ* na pele de cães naturalmente infectados
- Caracterizar as alterações da matriz extracelular (MEC) da pele de cães naturalmente infectados;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O parasita leishmania

As leishmanioses são um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas que acometem o ser humano e os animais, causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastidae*, incluídos na família *Trypanosomatidae* e no gênero *Leishmania* (LAINSON & SHAW, 1987). As leishmanioses são transmitidas por dípteros da subfamília *Phlebotominae* conhecidos como birigui, mosquito-palha, cangalhinha e outros. Sendo que apenas as fêmeas são hematófagas. Dois gêneros são incriminados como vetores das leishmanioses: o gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e o *Lutzomyia* no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1987). Cada espécie de *Leishmania* está adaptada a um número restrito de vetores e reservatórios, o que determina características próprias para o ciclo de transmissão de cada espécie (LAINSON et al., 1994).

As espécies do gênero *Leishmania* apresentam-se sob dois tipos morfológicos principais: amastigota e promastigota. As formas amastigotas são parasitos de células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF). As formas promastigotas apresentam flagelos e são encontradas no trato digestivo dos flebotomíneos (BATES, 1994; PEARSON & SOUSA, 1996).

Os membros deste gênero são protozoários intracelulares obrigatórios muito particulares, sendo que podem proliferar em fagolisossoma, ricos em enzimas, dos monócitos e macrófagos que constituem elemento primordial da resposta imune mediada por células (WHO, 1990; SACKS et al., 1993; TANNER, 1996). De acordo com Chang et al. (1990), as amastigotas de *Leishmania* constituem o único protozoário

parasita que sobrevive e se reproduz no fagolisossoma de macrófago em um pH de 4,5. As amastigotas se protegem neste meio extremamente ácido graças a uma ATPase transportadora de próton que mantém o ambiente intracelular do parasita em um pH de 6,5. Após a sua introdução no mamífero pelo vetor, as promastigotas ligam-se aos macrófagos através de diversos receptores celulares (TANNER, 1996). A interação com o complemento é considerada o episódio chave no estabelecimento de *Leishmania* como parasita intracelular (SACKS et al., 1993). O componente 3b do complemento (C3b) liga-se à superfície das formas promastigotas, subseqüentemente fagocitadas e envolvidas num vacúolo parasitóforo que se funde com os lisossomos (BRYCESON, 1996). Os parasitas sobrevivem à fagocitose e convertem-se em amastigotas no interior dos macrófagos não ativados por citocinas (PEARSON, 1993). As formas amastigotas multiplicam-se e rompem, eventualmente, o fagolisossomo, para infectarem em seguida outros fagócitos mononucleares (PEARSON & SOUSA, 1996).

As formas amastigotas que não penetram nos monócitos são destruídas, provavelmente por lise mediata pelo complemento (WHO, 1990), ativado pela via clássica ou alternativa (LOCKSLEY & LOUIS, 1992).

O complemento tem, contudo, efeito citotóxico diferente nas várias espécies, sendo a *Leishmania major* a mais susceptível e *Leishmania donovani* a mais resistente. Nas infecções com *L. donovani*, o papel biológico mais importante do complemento não será a lise do parasita, mas a viabilidade de ligantes facilitadores da fagocitose pelo macrófago (LOCKSLEY & LOUIS, 1992; TANNER, 1996). Além disso, a fixação a C3 favorece também a sobrevivência, impedindo presumivelmente o desencadear da explosão respiratória por metabólitos tóxicos do oxigênio (SACKS et al., 1993).

As leishmanias possuem em sua superfície duas glicoproteínas ancoradas em lipídios, que são componentes importantes na virulência deste parasita (MOSSER et al., 1987; MOSSER et al., 1992). Um dos glicoconjugados é o lipofosfoglicano (LPG) descrito em promastigotas e amastigotas, que forma uma camada de glicocálix denso e se liga ao C3b ou C3bi (PUENTES et al., 1988). Esses microorganismos resistem, entretanto, à lise pelo complemento C5C9 e são fagocitados pelos macrófagos via receptor CR1 do C (LFA-1) e CR3 (Mac-1 integrina). O LPG protege também o parasita dentro do fagolisossoma capturando radicais de O₂ e inibindo as enzimas lisossomais. O LPG é considerado a principal molécula de superfície e foi relacionado com a entrada do parasita nos macrófagos, podendo também ter a função de sobrevivência intracelular, como inibidor da atividade macrofágica (BLACKWELL,

1992; PANARO, et al., 1996). O segundo glicoconjugado é o gp63 (63kDa), que é uma proteinase zinco dependente que cliva o complemento e algumas enzimas lisossomais ligada a infectividade, importante na ligação dos parasitas aos macrófagos e previne a sua degradação no fagolisossoma (BOUVIER et al., 1985; BOUVIER et al., 1987). As amastigotas multiplicam-se inicialmente na pele, podendo depois disseminar-se através da corrente linfática e sangüínea para infectarem todo o SMF, causando doença crônica, por vezes fatal (PEARSON, 1993).

O gênero *Leishmania* está dividido em dois subgêneros - *Leishmania* e *Viannia*, classificação esta tomada por base no local de desenvolvimento no intestino do inseto vetor. As espécies do subgênero *Viannia* desenvolvem-se no intestino posterior antes de migrarem para os intestinos médio e anterior. O subgênero *Leishmania* inclui as espécies que perderam o desenvolvimento mais primitivo no intestino posterior e que ocupam apenas os intestinos médio e anterior (KILLICK-KENDRICK, 1990; WHO, 1990; GRIMALDI & TESH, 1993; KETTLE, 1995).

3.2. As leishmanioses

As leishmanias têm como principal característica a diversidade de tropismo, que resulta em diferentes formas de manifestação clínica, que podem variar desde a formação de uma lesão simples, capaz de evoluir para a cura espontânea, até a forma visceral, que se não for tratada adequadamente leva o paciente à morte (BRYCESON, 1996).

A expressão da leishmaniose é variável e reflete as complexas interações da virulência da espécie ou estirpe infectante com a resposta imune do hospedeiro (WHO, 1990; PEARSON, 1993; CABRAL, 1998). O resultado revela-se por um espectro de efeitos que pode variar de uma infecção assintomática ou subclínica, passando por lesões cutâneas localizadas e destruição tardia de membranas mucosas, até o envolvimento generalizado do SMF (SACKS et al., 1993; PEARSON e SOUSA, 1996).

Em função do caráter espectral das manifestações clínicas das leishmanioses muitos autores propõem uma classificação clínica, entretanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) divide e reconhece as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral (WHO, 1990).

3.2.1. Imunopatologia das leishmanioses

As leishmanioses emergiram como modelo experimental para a imunidade protetora contra agentes patogênicos intracelulares, mas relativamente poucos estudos imunológicos têm sido feitos em cães, mesmo sabendo que estes animais são reservatórios importantes e podem servir como modelo para a LV humana (ABRANCHES et al., 1991; PEARSON & SOUSA, 1996).

De acordo com estudos feitos por Convit et al. (1972) e Akufu et al. (1997) os fatores que influenciam ao aparecimento de um tipo ou outro de lesão estariam ligados não somente ao parasita, mas também ao hospedeiro, principalmente no que se refere ao desenvolvimento ou não de uma resposta imune eficaz e bem modulada, capaz de controlar a infecção.

Mosmann et al. (1986) descreveram dois tipos distintos de células TCD4⁺ denominadas Th1 (T *helper* tipo 1) e Th2 (T *helper* tipo 2), a classificação das leishmanioses ficou subordinada à expressão de citocinas. As células Th1 são produtoras de Interferon γ (IFN- γ), Interleucina 2 (IL-2) e linfotóxina (TNF- β) e as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. As células Th1 são capazes de induzir reação de hipersensibilidade retardada (DTH) (CHER & MOSMANN, 1987), enquanto que as Th2 estariam relacionadas com a estimulação de células B em virtude de sua habilidade em secretar fatores de crescimento e diferenciação para este tipo celular, como IL-4, IL-5 e IL-6 (GRIMALDI & TESH, 1993).

A resistência à infecção por *Leishmania* está relacionada com o desenvolvimento de células Th1 específicas para antígenos do parasita após a infecção, enquanto que a susceptibilidade relaciona-se com a expansão de células Th2 (LOCKESLEY et al., 1987; HEINZEL et al., 1989). O microambiente inicial de citocinas encontrado pelo parasita no momento da infecção tem influência determinante no tipo de célula T CD4⁺ que será estimulada. Caso este microambiente for rico em IL-4, as células T CD4⁺ precursoras se diferenciam em Th2 e estas, pela produção de IL-4, inibem a expansão das células Th1, antígeno-específicas, e conseqüentemente a produção de IFN- γ . Além das citocinas vários outros fatores existentes no microambiente podem modular o processo de infecção por *Leishmania* como: a interação com células apresentadoras de antígenos que podem preferencialmente apresentar diferentes classes de antígenos, a influência de outros sinais co-estimuladores, e os mecanismos sinalizadores diferenciais usados pelas subclasses de

células Th e a sua ligação com os seus receptores (GRIMALDI & TESHU, 1993).

Estudos realizados por Keenan et al. (1984a) com cães experimentalmente infectados, demonstraram que a presença de hipergamaglobulinemia, principalmente IgG (Imunoglobulina da classe G), não confere proteção. Entretanto, a cura e o estabelecimento de imunidade dependem tanto da produção de anticorpos, quanto da resposta celular.

3.3. A Leishmaniose Visceral (LV)

Nas Américas, a Leishmaniose Visceral (LV) é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, um protozoário intracelular obrigatório de células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF). Seu ciclo biológico é do tipo heteroxênico, envolvendo como transmissor as fêmeas de flebotomos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, que ao picar um animal vertebrado infectado para exercer o repasto sangüíneo, ingere juntamente com o sangue, células do SMF, macrófagos e leucócitos parasitados. Estas formas amastigotas transformam-se em promastigotas, multiplicam-se rapidamente no trato intestinal do flebotomíneo e ganham extrema agilidade para serem novamente inoculadas em um novo repasto sangüíneo sobre um hospedeiro não infectado (LAINSON & SHAW, 1978).

A LV é considerada a forma mais grave das leishmanioses, que se caracteriza pela disseminação do parasita para todos os órgãos ricos em células SMF. No homem, a doença se manifesta, clinicamente, por febre irregular, hepatoesplenomegalia, adenopatias, anemia, leucopenia, hiperglobulinemia e emagrecimento progressivo, podendo ser fatal se não for tratada adequadamente (PEARSON & SOUSA, 1996).

Cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* desenvolvem tanto as lesões viscerais quanto as lesões de pele (SLAPPENDEL, 1988). Apesar do viscerotropismo natural da *L. chagasi*, lesões de pele são as maiores manifestações freqüentes da leishmaniose canina (FERRER et al., 1988).

3.3.1. Patologia da Leishmaniose Visceral (LV)

Durante o repasto sanguíneo, os flebótomos infectados inoculam na pele do hospedeiro as formas promastigotas. Para que a infecção se estabeleça é necessário que essas formas penetrem no interior de células mononucleares e se transformem em formas amastigotas (BRAY & ALEXANDER, 1987). As amastigotas inicialmente se multiplicam dentro de macrófagos da pele, onde ocorreu a inoculação do parasita. Posteriormente elas se disseminam através da corrente sanguínea para órgãos internos, podendo desencadear alterações patológicas (PEARSON, 1993). Os indivíduos susceptíveis à LV falham em desenvolver uma resposta T específica contra a *Leishmania* e não apresentam reação de hipersensibilidade tardia aos antígenos parasitários. Além disso, as células mononucleares do sangue periférico desses pacientes não proliferam e nem produzem IFN γ ou IL-2 em resposta a antígenos de *Leishmania* (CARVALHO et al., 1985).

Histologicamente, na maioria dos órgãos, os macrófagos parasitados podem ser encontrados tanto de forma difusa como podem constituir granulomas e, às vezes, macrófagos parasitados podem estar associados a grandes quantidades de plasmócitos (RIDLEY, 1987). No fígado, observa-se hipertrofia das células de Kupffer, as quais podem estar intensamente parasitadas. Na medula óssea, os histiócitos parasitados vão gradativamente substituindo o tecido hematopoiético. O baço pode apresentar cápsula espessa, intenso parasitismo e hipotrofia da polpa branca (REY, 2002).

Estudos com cães experimentalmente infectados por *L. chagasi*, demonstraram que as principais alterações histológicas ocorreram em órgãos linfóides e tecido cutâneo. A maior delas foi a redução da população de linfócitos nas regiões paracorticais dos linfonodos e tonsilas, e na bainha linfocitária periarteriolar do baço. Uma outra característica morfológica importante observada foi a hiperplasia nodular e o aumento de células plasmáticas nos nódulos linfáticos dos linfonodos, tonsilas, placas de Peyer do baço, todas essas áreas predominantemente B-dependentes. Indicando que a infecção experimental a LV canina apresenta lesões semelhantes às observadas nos casos humanos. Os cães desenvolveram lesões cutâneas progressivas e evidências de supressão da imunidade mediada por células (KEENAN et al., 1984b).

3.3.2. Aspectos clínicos da leishmaniose Visceral Canina (LVC)

O período de incubação nas infecções naturais é de difícil estabelecimento, enquanto que nas infecções experimentais caninas foi observado um período bastante variável, podendo ser curto, em torno de três meses, até vários anos (CUNHA, 1938; RIOUX et al., 1979; GENARO, 1993). Na LVC a infecção pode evoluir para manifestações sistêmicas e crônicas, que culminam em morte na maioria dos casos. Em cães susceptíveis, a partir da infecção localizada na pele ocorre a disseminação do parasito por via linfática ou sangüínea, infectando macrófagos da medula óssea, gânglios linfáticos, do baço e do fígado, assim como dos rins e trato gastrointestinal, e, mais raramente sangue periférico (CARDOSO & CABRAL, 1998).

Os sinais clínicos iniciais da doença são a hipertrofia dos linfonodos poplíteos e uma dermatite furfurácea descamante localizada ou difusa. Observa-se a opacidade dos pêlos, presença de alopecia, onicogribose e edema de patas, como os sinais clínicos mais evidentes. Embora não estejam necessariamente presentes em todos os animais doentes outros sinais freqüentes ocorrem como febre, coriza, apatia, epixtasia, diarréia e hemorragia intestinal, hepatoesplenomegalia, hiperqueratose, despigmentação, ulcerações cutâneas, particularmente no focinho, nas orelhas e ponta da cauda, ceratoconjuntivite e uveíte (CUNHA, 1938; ALENCAR, 1959; GENARO et al., 1988; DEANE & DEANE, 1995).

De acordo com estudos feitos por Manciante et al. (1988) baseado em exame clínico de cães infectados por *L. infantum* na Ilha de Elba, na Itália, classificaram estes animais em três formas: cães assintomáticos: ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*; cães oligossintomáticos: com perda de peso moderada, lesões de pele, pêlos opacos; cães sintomáticos: presença de todos ou a maioria dos sinais patognomônico da doença, como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose, onicogribose), emagrecimento, ceratoconjuntivite e em alguns casos paresia dos membros posteriores. A identificação de cães oligossintomáticos e sintomáticos é melhor definida devido a presença de um ou mais sinais patognomônicos da infecção, principalmente quando o animal tem sua origem em regiões onde a doença já possui caráter endêmico já estabelecido.

3.4. O envolvimento do cão (*Canis familiaris*)

Em todo o mundo, a LV é uma das doenças parasitárias mais importantes e reemergentes (TESH, 1995). Possui caráter zoonótico na maioria das regiões onde ocorre e em algumas áreas epidêmicas, a mortalidade pode chegar a 98% nos casos não tratados. Do ponto de vista epidemiológico, a leishmaniose canina 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). Em um estudo realizado em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* na Espanha, concluiu-se que animais assintomáticos foram igualmente infectantes para os vetores (MOLINA, 1984).

Embora os cães tenham sido encontrados infectados durante os estudos iniciais na região amazônica, a importância da leishmaniose canina (LC) no Brasil foi somente reconhecida quando a epidemiologia da doença foi estudada em uma área de grande endemicidade, o Nordeste brasileiro. Estes estudos foram conduzidos no Ceará por Leônidas M. Deane e Maria P. Deane que forneceram grande contribuição ao esclarecerem o papel do cão como reservatório da *L. chagasi*. Também estabeleceram os aspectos básicos da epidemiologia da LC na região (DEANE, 1956; DEANE & DEANE, 1962), que hoje são válidos atualmente para estudos em outros focos no Brasil e em outros países neotropicais.

Atualmente, os cães são os principais mantenedores e disseminadores da *L. chagasi* no meio urbano. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) se caracteriza por apresentar um largo espectro de lesões que varia desde a infecção inaparente até uma forma clínica severa, que normalmente leva à morte do animal. As principais manifestações clínicas são perda de peso, hipertrofia generalizada dos linfonodos, hepatoesplenomegalia e lesões cutâneas e oculares (FERRER, 1992; LONGSTAFFE & GUY, 1995).

A *L. (L.) chagasi* e, ou *L. (L.) infantum* são conhecidas como causadoras da forma visceral em seres humanos 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 ser humano com leishmaniose cutânea (FERRER et al., 1986).

As formas amastigotas presentes na pele servem 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 ser humano e cães sadios (PINELLI et al., 1994).

3.5. A pele

Os parasitas depositados na pele do mamífero pelo flebótomo infectado, ultrapassam uma variedade de obstáculos, incluindo a matriz extracelular (MEC), as proteínas da camada basal para, em seguida, migrarem para outros órgãos ou estabelecer infecção dentro do fagolisossoma dos macrófagos (BRAY & ALEXANDER, 1987).

É vastamente conhecido que a resposta imune cutânea no estágio inicial da infecção tem papel determinante para o curso da doença. Dentro de poucas horas após a inoculação do parasita, ocorre uma massiva infiltração celular constituída predominantemente de macrófagos os quais entram em contato rapidamente com os parasitas. Os sinais mediadores do influxo dos macrófagos ocorrem através de citocinas quimiotáticas como a proteína quimiotática de monócito (MCP-1) (MOLL, 1993).

Portanto, avaliar as alterações cutâneas torna-se importante devido a sua influência na transmissão da doença. Em cães susceptíveis, a infecção localizada na pele segue à disseminação do parasito, através dos histiócitos, células de Langerhans e,ou, células dendríticas, para os linfonodos, medula óssea, baço, fígado, rim, pulmões e trato gastrointestinal (VIDOR et al., 1991; MARCHAL et al., 1997; SLAPPENDEL & GREENE, 1998).

Estudos mostram que a pele exerce um importante papel no sistema imune, funcionando como uma potente barreira e secretando substâncias biologicamente ativas que protegem o organismo da ação de agentes agressores (BOS & KAPSENBERG, 1986). É composta pela epiderme, uma camada de tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado e pela derme, a camada de tecido conjuntivo denso, não modelado (GARTNER & HIATT, 1999), que por sua vez é constituído por uma variedade de células e uma matriz extracelular, um complexo de macromoléculas, produzidas por fibroblastos e exportadas por eles para o espaço intercelular (BANKS, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O tecido conjuntivo e as membranas basais são as principais barreiras envolvidas na invasão, disseminação e nutrição de parasitas. A secreção de enzimas proteolíticas pelo parasita é de fundamental importância na interação entre este e o hospedeiro. Esta interação inclui invasão e destruição do tecido do hospedeiro, e a habilidade do parasita em migrar para o local específico e ou estabelecer condições nutricionais que favoreçam o seu desenvolvimento (RHOADS & FETTERER, 1997).

Estudos relatam uma participação direta da matriz extracelular nos eventos iniciais da leishmaniose cutânea humana causada por *L. braziliensis* (ESTERRE et al., 1991).

Várias pesquisas comprovam que os parasitas produzem proteases que degradam proteínas da matriz extracelular (MEC), facilitando a penetração na barreira dérmica e difusão da infecção. Quando as formas promastigotas da leishmania são inoculadas na pele do hospedeiro ocorre um afrouxamento ou desprendimento da matriz do tecido conjuntivo da derme, permitindo então o estabelecimento da infecção (LIRA et al., 1997).

3.6. 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, as proteínas estruturais constituindo o colágeno e elastina; 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, outras proteínas da matriz e moléculas de superfícies de células, o que a permite exercer importantes funções relacionadas à adesão, migração ou reconhecimento de micro ambiente e as Proteoglicanas que são as GAGs sulfatadas que ao estabelecerem ligações covalentes com um núcleo de proteína formando esta família de macromoléculas. Constituída por uma proteína central a qual se adere a cadeia longa de dissacarídeos repetidos denominado de glicosaminoglicanas (GAG) 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; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

As GAGs são polissacarídeos não flexíveis e não ramificados que dividem-se em dois grupos: as não sulfatadas (ácido hialurônico), uma macromolécula muito grande que não forma ligações covalentes com moléculas de proteínas, e as sulfatadas (queratan sulfato, heparan sulfato, heparina, dermatan sulfato e os sulfatos de condroitino- 4 e sulfato de condroitino- 6 (GARTNER & HIATT, 2001).

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).

Com base na natureza química, os componentes fibrosos da MEC foram agrupados em dois sistemas: colágeno e elástico (MONTES, 1996).

3.6.1. 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 (BANKS, 1992).

Os tipos de colágeno mais conhecidos e de maior interesse em nosso estudo são: o colágeno tipo I, que possui as moléculas organizadas em duas cadeias alfa 1 (I) e uma cadeia alfa 2 (II). Os tipos II e III estão constituídos por três cadeias idênticas, que podem ser representadas pelas seguintes fórmulas: $[\alpha_1 (II)]_3$ e $[\alpha_1 (III)]_3$, respectivamente (VAN DER REST & GARRONE, 1991).

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 cimento. 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).

O uso de técnicas histoquímicas possibilitou o conhecimento da biologia dessa família de macro moléculas. Dentre essas técnicas, destaca-se o método do Picro Sirius Red sob luz polarizada, que muito tem contribuído para a compreensão da fisiologia e dos processos patológicos relacionados ao sistema colágeno. Esta técnica permite identificar alguns tipos de colágenos em cortes de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (MONTES, 1996). Além disso, tem sido empregada no estudo da degradação dessas proteínas (JUNQUEIRA et al., 1980 a,b; LUQUE & MONTES, 1989).

A observação que os colágenos tipo I, tipo II e tipo III mostram interferências de cores e intensidades de birrefringências diferentes na mesma secção de tecido pode ser explicada pelo fato amplamente conhecido que diferentes colágenos intersticiais mostram padrões distintos de agregação física. Então, o colágeno tipo I forma fibras espessas e, conseqüentemente, apresenta uma intensa birrefringência que vai da cor amarela ao vermelho. O colágeno tipo III forma fibras finas mostrando uma fraca birrefringência que sob luz polarizada é visualizada em cor verde (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).

Pesquisas feitas por Lira et al. (1997) constataram 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, causando 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 profundamente coradas e formavam estruturas densas emaranhadas. O maior pronunciamento das fibras reticulares foi observado nas áreas onde o infiltrado inflamatório era mais intenso e onde o septo pulmonar apresentava-se mais espesso quando comparado com os pulmões dos animais controle normais.

Através de estudos histoquímicos de proteínas fibrilares da matriz extracelular em neoplasias mamárias benignas e malignas em cães, constatou-se a presença do colágeno sob a forma de fibras espessas distribuídas irregularmente no estroma dos carcinomas e de modo mais ordenado e regular nas neoplasias benignas e, fibras mais finas, em menor quantidade, irregularmente e aleatoriamente dispostas nos carcinomas e regularmente nas neoplasias benigna. Sob luz polarizada os feixes de fibras colágenas,

apresentaram diferentes comprimentos, avermelhados ou amarelados e fortemente birrefringentes, sugerindo serem colágeno tipo I e, entre as fibras, algumas mais finas, pálidas, esverdeadas e fracamente birrefringentes, presumivelmente colágeno tipo III. Em áreas condrometaplásicas, tanto nos carcinomas como nas neoplasias benignas notou-se que os feixes colágenos apresentavam-se com fibras finas, paralelas, limitando regiões estreitas onde os condrócitos se aninhavam, e, envolvendo esta área, feixes de fibras espessas, anastomosadas, dispostas irregularmente nos carcinomas e ordenadas e paralelas nas neoplasias benignas. Sob luz polarizada, essa população entre condrócitos era formada por fibras pálidas e amareladas, sugerindo padrão tipo II e na faixa circundante, feixes fortemente birrefringentes, sugerindo o padrão do colágeno tipo I (MARTINS et al., 2002).

3.6.2. Sistema Elástico

O sistema elástico está constituído por três tipos de fibras: as elásticas, as elaunínicas e as oxitalânicas. As fibras deste sistema são compostas por duas proteínas: a fibrilina que dá origem às bainhas de microfibrilas e a elastina que se deposita no espaço entre as microfibrilas. Estudos indicam que as fibras oxitalânicas são constituídas somente pelas microfibrilas; as fibras elaunínicas, por microfibrilas pobremente envolvidas pela elastina e as fibras elásticas, compostas por microfibrilas fortemente envolvidas pela elastina (COTTA-PEREIRA et al., 1976, GHADIALLY, 1988, COTTA-PEREIRA et al., 1989).

Vários fatos implicam que os três diferentes tipos de fibras do sistema elástico pertencem a uma série contínua, a ordem cronológica durante a histiogênese iniciando pelas fibras oxitalânicas, passando a fibras eulanínicas e tornando-se maduras como as fibras elásticas (MONTES, 1996). Estudos mostram que as fibras oxitalânicas precedem as fibras elásticas em granulomas pós-inflamatórios (FEHER et al., 1971).

É notável que uma distribuição diferencial das fibras do sistema elástico coincide com tipos estruturalmente distintos de colágenos que também são secretados por diferentes compartimentos em vários órgãos, isto é, na pele (COTTA-PEREIRA et al., 1976; JUNQUEIRA et al., 1983), nervos (MONTES et al., 1984; FERREIRA et al., 1987), cartilagem hialina (COTTA-PEREIRA et al., 1989) e tendões (CALDINI et al., 1990).

De acordo com pesquisas realizadas por Martins et al. (2003) em estudos histoquímicos de proteínas fibrilares da matriz extracelular em neoplasias mamárias benignas e malignas de cães demonstraram a presença do sistema elástico em tumores benignos e malignos, verificou-se que há predomínio dessas fibras nos malignos, principalmente na pseudocápsula e ao redor de ácinos e túbulos. Elementos do sistema elástico não foram observados em espécimes submetidos à coloração de Weigert sem oxidação. Neste mesmo material, com oxidação, as fibras oxitalânicas foram mais evidentes principalmente ao redor de ácinos, túbulos e pseudocápsula. Elementos do sistema elástico na MEC foram raros, tanto em amostras com e sem oxidação. Isto pode ser observado de maneira semelhante tanto em tumores benignos e malignos. Esta pesquisa comprova as alterações estruturais das fibras do sistema elástico na matriz extracelular de neoplasias mamárias na espécie canina.

3.6.3. 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 destacado o potencial papel de resíduos de açúcares como ligantes para a aderência de parasitas protozoários (JUNGERY, 1985; MARKWELL, 1980). Este interesse tem se desenvolvido 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 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 neovascularização; 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 um componente chave em vários processos biológicos (WYLER, 1987). Esta 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. Existe uma grande evidência que a fibronectina exerce um papel importante na adesão e ligação de parasitas nas células hospedeiras, incluindo a ligação entre as formas promastigotas de *Leishmania* e macrófagos hospedeiros. Essa interação tem recebido considerável atenção e tem-se evidenciado que esta ligação do parasita à célula hospedeira é mediada por um evento específico (BLACKWELL et al., 1984).

Pesquisas sobre a aderência mediada pela fibronectina em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e amastigotas em monócitos humanos têm sido demonstradas por Wyler (1985).

Estudos mostram que a interação entre células hospedeiras e a membrana dos parasitas é um pré-requisito importante para o ciclo de vida de muitos protozoários intracelulares. Relata-se que há o envolvimento de receptores dos macrófagos e moléculas das promastigotas na adesão das formas promastigotas às células alvo dos hospedeiros, como exemplo tem sido mostrado que o receptor mannose/fucose (BLACKWELL et al., 1984) e o receptor do complemento tipo 3 (CR3) (MOSSER et al., 1987) são implicados no processo de adesão parasita à célula hospedeira.

Wyler et al. (1985) têm demonstrado que anticorpos policlonais anti-fibronectina poderiam inibir a adesão do parasita às células do hospedeiro e tem-se sugerido o envolvimento do receptor de fibronectina em macrófagos (FnR) no reconhecimento nas células hospedeiras.

Rizvi et al. (1988), descrevem em seus trabalhos que a gp63 é uma molécula fibronectina-like 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.

Estudos mostram que a fibronectina tem um papel importante em certas doenças parasitárias. *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* prendem-se à fibronectina do hospedeiro facilitando sua associação com as células de seus parasitas. (WYLER, 1987).

Entamoeba histolytica e *Schistosoma* spp. produzem proteases que degradam as fibronectinas e outras proteínas da matriz, presumivelmente facilitando a penetração na barreira da mucosa intestinal (WYLER, 1987).

3.6.4. Laminina (LN)

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 se ligue de um lado com os receptores específicos da superfície celular (integrinas) e do outro, 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 à adesão a macrófagos e que a entrada na célula é mediada pela interação da laminina com os receptores laminina/parasita.

3.7. Uso da imunohistoquímica em biópsias de pele como ferramenta diagnóstica em leishmanioses

Os métodos empregados para o diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) incluem: a detecção microscópica do parasita na medula óssea e aspirados de linfonodos corados com Giemsa, demonstração de anticorpos específicos anti-*Leishmania* em soros infectados de animais pelas técnicas de imunofluorescência Indireta, Fixação de complemento, Ensaio imunoenzimáticos, e isolamento do parasita por meio de cultura *in vitro* ou inoculação em hamster (WHO, 1990). Entretanto um diagnóstico definitivo é baseado na detecção do parasita (TAFURI, 2001).

A direta detecção de parasitas em biópsias de pele em cães com leishmaniose visceral pode ser obtida através de um simples procedimento cirúrgico, sendo esta uma boa ferramenta para um diagnóstico seguro e definitivo acompanhados pelo estado clínico do animal. Entretanto, na pele, exames histopatológicos rotineiramente preparados com Hematoxilina-Eosina são frequentemente inconclusivos (FERRER et al., 1988; BOURDOISEAU et al., 1997; TAFURI et al., 2001).

A detecção das formas amastigotas através da imunohistoquímica de tecidos de cães fixados em formalina tamponada e incluídos em parafina (FERRER et al., 1988; BOURDOISEAU et al., 1997) de tecidos humanos (LIVINI et al., 1983) tem sido previamente descrita como métodos rotineiramente utilizados por muitos laboratórios e vem se tornando uma alternativa eficiente, como diagnóstico seguro, não muito dispendioso no qual se utiliza soro de cães naturalmente infectado como anticorpo primário, acompanhado de um sistema de detecção com anticorpo secundário biotilado de cabra anti-camundongo e anticorpo anti-coelho. Este método é considerado uma excelente ferramenta de estudo clínico, epidemiológico e histopatológico.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Os animais utilizados nesta pesquisa foram cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados com *Leishmania chagasi* portadores de diferentes formas clínicas da leishmaniose visceral procedentes da cidade de São Luís-Maranhão.

As análises foram realizadas em conjunto com o laboratório de Histopatologia do Departamento de veterinária/UFV; Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários LBCH/BIOAGRO e Laboratório de Imunomodulação de Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ-RJ.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Maranhão e pelo Comitê de Ética do IOC (P 062/00).

4.1.1. Escolha dos cães

Foram selecionados 60 cães de ambos os sexos, adultos, sem raça definida (SRD), capturados e mantidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de São Luís-MA, onde foi realizada a uma pré-seleção clínica dos cães. Deste total, 40 cães foram sorologicamente positivos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e os demais 20 cães, sorologicamente negativos pela RIFI, sem dermatopatias que serviram como padrão normal para a pesquisa foram obtidos através de triagem clínica e sorológica pelo Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Maranhão/HV-UEMA.

4.2. Distribuição dos grupos

Os cães selecionados nesta pesquisa foram classificados clinicamente de acordo com a ausência ou presença da infecção como oligossintomáticos e sintomáticos conforme descrição de Manciante et al. (1988).

Grupo I - Cães sintomáticos com lesões de pele: 20 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de São Luís-MA (CCZ/SL/MA) com sorologia positiva para leishmanioses, apresentando mais de três sinais clínicos da doença como alopecia, emagrecimento, lesões cutâneas, onicogribose, ceratoconjuntivite, dentre outros (Figura 1).

Grupo II - Cães oligossintomáticos com lesões de pele: 20 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de São Luís-MA (CCZ/SL/MA), sorologicamente positivos, apresentando até no máximo três sinais clínicos da doença como lesões cutâneas cicatriciais ou ativas, emagrecimento, alopecia, dentre outros (Figura 2).

Grupo III - Cães sorologicamente negativos para leishmaniose canina: sem lesões cutâneas e com sorologia negativa para leishmaniose (grupo controle negativo).

Cães sintomáticos com lesões cutâneas G I:



Figura 1 – Cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, do grupo I, sintomáticos. Sinais clínicos acentuados de leishmaniose: emagrecimento, alopecia generalizada, lesões generalizadas.

Cães oligossintomáticos com Lesões cutâneas G II:



Figura 2 – Cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, do grupo II, oligossintomáticos. Sinais clínicos moderados de leishmaniose: úlceras e áreas de alopecia localizada.

4.3. Obtenção das amostras de sangue dos cães

Foram colhidos de todos os animais do experimento três mL de sangue em frasco sem anticoagulante em seringas descartáveis de 10 cc, através de venopunção da veia radial ou jugular externa. O sangue obtido foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos para obtenção das amostras do soro, logo em seguida foram feitas alíquotas do soro, congelamento e armazenamento à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso nos testes sorológicos.

4.4. Reação de Imufluorescência Indireta (RIFI)

Os soros obtidos dos cães foram reavaliados pela técnica de Reação Imunofluorescência Indireta (RIFI). Para esta técnica foi utilizado o kit para diagnóstico de leishmaniose canina empregando o conjugado específico anti-IgG de cão produzido e comercializado por BIOMANGUINHOS, FIOCRUZ, RJ.

As lâminas foram preparadas para a técnica da RIFI, depositando-se 10 μL de antígeno de *Leishmania donovani* sobre as áreas demarcadas. Em seguida, retirou-se todo o excesso de líquido deixando-se apenas uma película de antígeno recoberto a área. Procedeu-se à secagem em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sendo o material estocado à -20°C até o momento do uso. Foram utilizadas diluições seriadas (1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640) do soro em solução salina pH 7,4 (PBS), transferindo-se depois 10 μL para as correspondentes marcações das lâminas. Estas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos em câmara úmida e para remoção dos soros, lavou-se duas vezes durante 10 minutos com PBS.

Após a secagem das lâminas estas foram recobertas com conjugado fluorescente, diluído à 1:100, contendo 1 mg de Azul de Evans, seguindo de nova incubação em câmara úmida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos e lavagem duas vezes em PBS e depois em água destilada. As lâminas foram secas e montadas em glicerina tamponada e lamínula, e observadas ao microscópio de fluorescência em objetiva de 40X até a última diluição em que se observou a fluorescência do flagelo do parasita, sendo esta considerada o nosso maior título. Os cães que apresentaram titulações iguais ou maiores que a diluição 1:40 foram considerados soro positivos para leishmaniose de acordo com o critério estabelecido pelo Ministério da Saúde (FUNASA, 1999).

4.5. Detecção de IgGs anti-*Leishmania* por ELISA

Anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* foram detectados pelo ensaio imunoenzimático de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) para Leishmaniose canina através do kit ELISA diagnóstico de leishmaniose canina com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* (complexo *L. donovani*) obtidos a partir de cultura *in vitro*, lote 041EL002Z – Biomanguinhos/ FIOCRUZ/RJ. Resumidamente, as placas de ELISA do kit já sensibilizadas com uma solução de tampão carbonato pH 9,6 (0,159g Na₂CO₃; 0,293g NaHCO₂; milli Q q.s.p. 100mL), na qual os antígenos de leishmania foram diluídos na quantidade de 1µg/well, deixando-se adsorver a temperatura ambiente por um tempo médio de 12h. Decorrido este período, as placas foram lavadas duas vezes com tampo de lavagem (9,0g de NaCl; 0,5mL Tween 20, H₂O dd q.s.p. 1000mL), sendo em seguida armazenadas em freezer -20 °C. Para utilização as placas já sensibilizadas foram retiradas do freezer e, após atingirem a temperatura ambiente, foi adicionada a solução de bloqueio-caseína 2% em PBS pH 7,6 (4,25g NaCl; 0,64g Na₂HPO₄; 0,068g NaH₂PO₄.H₂O milli Q q.s.p. 500 mL) por uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e posteriormente adicionou-se 100µ/well dos soros dos animais do experimento diluídos em 1:100 em tampão de incubação (87,5 mL de PBS pH 7,6; 12,5 mL de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50µL de Tween 20), deixando-se incubar por 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas seis vezes com o tampão de lavagem e procedeu-se a incubação, por 30 minutos a 37 °C, do anticorpo secundário-IgG de coelho anti-IgG de cão conjugado com peroxidase. Após esse tempo as placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e adicionou-se a solução reveladora no volume de 100 µL/well, composta por 20 mL de tampão substrato (7,19g NaHPO₂; 5,19g ácido cítrico e H₂O milli Q q.s.p. 1000mL), 4mg de TMB (tetrametilbenzidina) e 2,5 µL de H₂O₂, por um período de 30 minutos ao abrigo da luz. A reação foi bloqueada com 30µL/well de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (espectrofotômetro) equipado com filtro de 450nm.

Para discriminar o ponto de corte (cut-off) entre positivo e negativo para a respostas sorológica mensurada no teste de ELISA, foi usada a média da densidade ótica dos controles negativos multiplicado pelo fator de correção 2.

4.6. Biópsia de pele

Após o exame clínico e coleta do sangue, os animais foram sedados usando-se Acepromazina a 1% na dose de 0,1 mg/10kg por via intramuscular. Após a escolha da lesão ou área da biópsia procedeu-se com a infiltração de lidocaína a 2% subcutaneamente. Seguida à sedação e ao bloqueio regional do animal obteveram-se fragmentos de pele, usando-se punch 0,6 cm de diâmetro e em alguns casos o bisturi. Uma vez retirado, o fragmento foi seco com papel absorvente para em seguida ser colocado sobre um pedaço de cartolina porosa, com a derme voltada para baixo sob uma mínima pressão com a finalidade de diminuir a deformação do espécime após a fixação, evitando curvaturas e ondulações epidérmicas, objetivando melhor orientação anatômica.

4.7. Análises histológicas

O material destinado a análises histológicas, histoquímica e imunohistoquímica foi fixado em formalina a 10% neutra tamponada (pH 7,2) por 48 h. Após a fixação, os fragmentos de tecidos foram desidratados em soluções alcólicas crescentes (álcool 70%, 80%, 90% e 100% I e II), permanecendo durante 1h em cada solução alcoólica. Posteriormente os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina (PROPHET et al., 1992). Os cortes histológicos dos tecidos foram seriados a 4µm de espessura em micrótomo de rotação HM 360 MICROM®, sendo os mesmos corados segundo a técnica da Hematoxilina-Eosina (H&E), conforme LUNA (1968).

Para a técnica de imunohistoquímica para espécimes congelados, os fragmentos 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 °C, a 4µm de espessura.

4.7.1. Análises histoquímicas do sistema colágeno

A observação que os colágenos do tipo I, tipo II e tipo III mostram diferentes interferências de cores e intensidades de birrefringências na mesma seção de tecido podem ser explicadas pelo conhecido fato destes diferentes colágenos intersticiais mostrarem padrões diferentes de agregação física (MONTES et al, 1980; CARRASCO et al., 1981). Salienta-se que o tipo de colágeno padrão normal da pele sem alterações é predominantemente do tipo I (MONTES, 1996).

Método Picrus Sirius Red (MONTES, 1996)

A avaliação dos colágenos tipo I e tipo III foi feita através desta técnica Histoquímica, com o uso do corante Sírius Red (SR) - Direct Red-80® e visualização em microscópio de polarização.

O Sírius Red (SR) é um corante ácido que contém seis grupamentos sulfônicos tem sido muito utilizado para o estudo do colágeno, uma proteína rica aminoácidos que se cora facilmente com corantes ácidos. O SR é constituído por uma molécula corante alongada que reage e promove um aumento de sua birrefringência natural, pois muitas moléculas do corante são paralelas ao eixo longo da cadeia de cada molécula de colágeno, o que pode ser facilmente evidenciado através de filtros de polarização (MONTES, 1996).

O corante é preparado com 0,1g de Sirius Red para 100mL de solução saturada de ácido pícrico. Para a saturação do ácido pícrico dilui-se 1,5g de ácido pícrico em 100mL de água destilada.

Os tecidos fixados em formol tamponado neutro foram processados e incluídos em parafina, e posteriormente seccionados à espessura de 4µm. Após este tratamento, os cortes foram desparafinizados em banhos em xileno em seguida hidratados e corados com o Sirius Red-Direct Red 80 por 1 hora, lavados rapidamente e contra-corados com Hematoxilina por 3 minutos, sendo então as lâminas desidratadas e montadas. A observação das lâminas foi feita ao microscópio de luz polarizada.

A morfometria para contagem do percentual de colágeno foi feita através de uma gradícula contendo 121 interseções a qual foi sobreposta sobre a foto de cada lâmina em aumento de 400X, possuindo 400µ².

Reticulina de Gordon & Sweets (PROPHET, 1992)

Esta técnica permite a clara visualização do colágeno do tipo III como fibras finas dispostas não somente no estroma denso, mas também no tecido adjacente.

Os tecidos fixados em formol tamponado neutro foram processados e incluídos em parafina, posteriormente seccionados à espessura de 4µm. Logo após, os cortes foram desparafinizados e hidratados, tratados com Permanganato de Potássio a 0,5% durante 5 minutos e lavados seis vezes em água destilada. Em seguida cada lâmina foi imersa em solução aquosa de ácido oxálico 5%, lavadas novamente e tratadas com solução aquosa de Alúmen de Ferro 8% durante 15 minutos em seguida lavadas e tratadas com solução argêntica, lavadas e colocadas em solução de formol 10% até os cortes ficarem com uma tonalidade enegrecida. Após este procedimento as lâminas foram lavadas rapidamente e tratadas com Cloreto de Ouro 1:500 (0,1%) durante 1 minuto, lavadas em seguida. Posteriormente os cortes foram tratados com Orange G por 3 minutos. Em seguida os cortes foram desidratados com álcool absoluto rapidamente, as lâminas levadas à estufa a 60°C até secarem, tratados com álcool absoluto novamente e xileno, a seguir montadas. As lâminas foram observadas em microscopia de luz.

4.7.2. Análises Histoquímicas do Sistema Elástico

Técnica de Verhoeff (PROPHET, 1992)

Os tecidos fixados em formol tamponado neutro foram processados e incluídos em parafina, posteriormente seccionados à espessura de 4µm. Logo após os cortes foram desparafinizados e hidratados gradualmente e lavados. Logo em seguida, corados por 15 minutos pela solução contendo 20mL de hematoxilina a 5% diluída em álcool absoluto, 8 mL de cloreto férrico a 10% em água destilada, 8 mL de solução de Iodo a 1% e Iodeto de Potássio a 2% diluídos em água destilada. Após este intervalo de tempo, as lâminas foram lavadas e diferenciadas em Cloreto Férrico a 2% até que as fibras elásticas aparecessem em preto e os outros tecidos em cinza. Esta etapa foi controlada com auxílio de microscópio de luz. Lavou-se novamente e cobriram-se as lâminas com

álcool 95% rapidamente para remover o excesso de corante derivado do Iodo. Os cortes foram secas e em seguida desidratadas em soluções crescentes de álcoois (70%, 80%, 95%, absoluto I e II), imersos em xileno e montados com lamínula. As lâminas foram observadas em microscopia de luz.

4.8. Análises imunohistoquímicas

As amostras coletadas foram submetidas às análises imunohistoquímica segundo as técnicas citadas abaixo, a fim de detectar a presença de parasitas e alterações estruturais nos constituintes da matriz.

4.8.1. Imunoperoxidase indireta para detecção do parasita *in situ*.

Para detecção das formas amastigotas de leishmania na pele dos cães realizou-se um estudo imunohistoquímico através do sistema Catalyzed Signal Amplification System Peroxidase descritas a seguir (COSTA et al., 1995).

Sistema Catalyzed Signal Amplification System Peroxidase (CSA/ K1500, DAKO®)

Os cortes foram desparafinados em xilol (2 banhos de 30 minutos), hidratados em banhos de 5 minutos de soluções alcoólicas decrescentes (absoluto I e II, 90%, 80% e 70%) e em água corrente. Depois desta etapa, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, usando peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida os cortes foram colocados em solução de Tris HCl por cinco minutos em forno microondas, para fazer o desmascaramento de antígeno. Foram lavados em PBS pH 7.2 (3 banhos de 5 minutos em sob agitação), bloqueados com protein block (soro não imune de camundongo) durante cinco minutos. Posteriormente, aplicado 30 µL de soro primário diluído 1/600 (soro policlonal de camundongo anti-*Leishmania*) e incubado durante 40 minutos em câmara úmida. Lavados em PBS pH 7.2 e, então incubados durante 15 minutos em **link antibody**¹. Lavagem novamente em

¹ Parte integrante do kit DAKO- Distribuidor do produto.

PBS e incubado durante 15 minutos em câmara úmida a 37° C. Lavagem em PBS e aplicado o **apply amplification reagent** e, deixado incubando durante 15 minutos em câmara úmida a 37° C. Lavado em PBS, e aplicado o **complexo streptoavidina-peroxidase** Revelado com DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride) em 2 mL de peróxido de hidrogênio a 10%, controlando o tempo de revelação. Lavado em água corrente e destilada. Contracorados em hematoxilina de Harris durante 30 segundos. Desidratado em soluções crescentes de álcool. Montagem em ENTELLAN.

4.8.2. Imunohistoquímica para Fibronectina, Laminina e *Leishmania*

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 °C, a 4µm 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. Logo após pingou-se 30µL do anticorpo primário diluído em saponina (soro humano hiperimune anti-*Leishmania* 1:300 +PGN + 0,1% saponina) nos tecidos. As lâminas foram encubadas em câmara úmida por 40 minutos. Após este período lavou-se 3 vezes em PBS por 5 minutos cada lavagem com uma leve agitação. Em seguida pingou-se 30µL do anticorpo secundário cabra anti-humano conjugado com CY3 (molécula vermelha) diluído 1:100 em PGN + 0,1% saponina. Novamente encubou-se em câmara úmida por 40 minutos ao abrigo da luz. Lavou-se novamente em PBS. Os tecidos foram lavadas em PBS e secos suavemente, sendo em seguida depositados 30µL do segundo anticorpo primário diluído em PGN+saponina, para fibronectina foi utilizado o anticorpo monoclonal camundongo anti-fibronectina 1:150 (BD TRANSDUCTION LABORATORIES® 14420-050) e para laminina usou-se o anticorpo monoclonal camundongo anti-laminina 1:150 (ZYMED® 335300), 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 segundo anticorpo secundário. Tanto para fibronectina quanto para

laminina foi utilizado o anticorpo secundário cabra anti-camundongo conjugado com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) molécula verde. 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.

4.9. Análises Estatísticas

As médias dos resultados obtidos das porcentagens do colágeno e das absorbâncias obtidas pelo ELISA foram comparadas entre os grupos infectados e grupo controle, utilizando o teste T de Student a 5% de significância através do programa estatístico SAEG 8.0 (RIBEIRO, 2001).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação Clínica

Os cães foram clinicamente selecionados de acordo com Manciante et al. (1988), em sintomáticos e oligossintomáticos, de acordo com a Tabela 1.

Os cães sintomáticos (G I) que apresentavam acima de três sinais clínicos da infecção e tiveram as maiores freqüências foram: emagrecimento (100% dos cães), alopecia generalizada (75%), dermatite furfurácea (55%), úlceras generalizadas (60%), onicogribose (100%), pelagem opaca (100%), além destes sinais, alguns cães apresentavam, linfadenopatia, epixtasia, opacificação de córnea e ceratoconjutivite e paresia de trem posterior.

Os principais sinais no grupo dos cães oligossintomáticos (G II) que apresentavam até três sinais clínicos sugestivos de infecção por *L. chagasi*, foram: alopecia localizada (70% dos cães), úlceras localizadas principalmente nas pontas das orelhas e focinho (100%), emagrecimento (45%), onicogribose (55%), pelagem opaca (30%) (Tabela 1). Todos os sinais clínicos observados nos grupos I e II têm sido alvos de grandes discussões na literatura, e embora estes sinais sejam observados tanto nas infecções naturais como nas experimentais, ainda há muitas divergências entre os vários pesquisadores em relação à classificação sintomática da doença (ALENCAR, 1959; CUNHA, 1938; GENARO et al., 1988; FERRER, 1992; LONGSTAFFE & GUY, 1995; DEANE & DEANE, 1995).

Tabela 1. Sinais clínicos percentuais observados e utilizados para classificação dos cães em sintomáticos (GI), oligossintomáticos (GII) e não infectados (GIII) na cidade de São Luis-MA.

SINAIS CLÍNICOS	GRUPOS CLÍNICOS		
	G I (n=20)	G II (n=20)	G III (n=20)
Emagrecimento	20 (100%)	9 (45%)	N.O.
Alopecia localizada	5 (25%)	14 (70%)	N.O.
Alopecia generalizada	15 (75%)	N.O.	N.O.
Dermatite furfurácea	11 (55%)	4 (20%)	N.O.
Opacidade de córnea	6 (30%)	N.O.	N.O.
Úlceras localizadas	8 (40%)	20 (100%)	N.O.
Úlceras generalizadas	12 (60%)	N.O.	N.O.
Ceratoconjuntivite	5 (25%)	N.O.	N.O.
Onicogribose	20 (100%)	11 (55%)	N.O.
Pelagem opaca	20 (100%)	6 (30%)	N.O.
Paresia das patas	1 (5%)	N.O.	N.O.
Epistaxia	6 (30%)	N.O.	N.O.

Nota: N.O. (sinal clínico não observado); n = número de cães em cada grupo.

Hoje, existe uma tendência, tanto do Velho como no Novo mundo de se aplicar a classificação sugerida por Manciante et al. (1988), utilizada para os estudos de leishmaniose canina espontânea ou natural e nas infecções experimentais com parasitos do complexo *Donovani* (PINELLI et al., 1994; CARDOSO & CABRAL, 1998).

Assim, ao relacionarmos as frequências de sinais clínicos apresentados com os grupos de cães estudados (G I e G II), constata-se que a doença evolui de um quadro menos grave da doença apresentado pelos os cães oligossintomáticos, para um estado

grave e terminal, apresentado pelos cães sintomáticos, concordando com pesquisas feitas por Genaro (1993).

Em geral, o quadro clínico da leishmaniose visceral canina assemelha-se à doença humana, com febre irregular, palidez das mucosas, emagrecimento progressivo e estado de caquexia intensa na fase terminal da doença. Pode ocorrer hipertrofia do sistema monocítico fagocitário (SMF) levando a esplenomegalia, hepatomegalia e adenopatia generalizada, sendo bastante encontrados embora pouco referidos, sinais clínicos semelhantes aos achados nos cães dos grupos I e II deste trabalho (ALENCAR, 1959; KEENAN et al., 1984a)

Entretanto, os sinais mais evidentes estão relacionados às alterações cutâneas, tais como a opacificação da pelagem e perda de pêlos, podendo ser local ou generalizada; pequenas ulcerações crostosas, isoladas ou confluentes, observadas no focinho, orelhas e extremidades (MARZOCHI et al., 1985), as quais foram freqüentemente observadas nos animais dos grupos I e II. De acordo com Hommel (1978), a perda de pêlo tem sido explicada pela ação direta da *Leishmania* sobre o folículo piloso ou por distúrbio do metabolismo do ácido pantotênico, causado por lesões hepáticas, ou ainda pela deposição de imunocomplexos na membrana basal da pele induzindo a um processo auto-imune que desencadeia a alopecia.

As lesões oculares têm sido documentadas com muita freqüência e são caracterizadas, principalmente, por conjutivites e ceratites, tendo seu início com uma ligeira opacificação de córneas (DEANE & DEANE, 1955; GENARO, 1993). A observação da freqüência de opacificação de córnea em 6% dos animais do grupo I pode indicar a evolução clínica da doença para grau mais severo.

O emagrecimento é um dos sinais mais observados na leishmaniose visceral canina (ALENCAR, 1959; MARZOCHI, et al., 1985) também observado por Lanotte et al. (1979) e Genaro (1993) em cães experimentalmente infectados com *L. donovani* e *L. chagasi*. Neste estudo com cães naturalmente infectados com *Leishmania* constatamos uma alta freqüência deste sinal clínico nos animais dos grupos I (100%) e II (45%). Provavelmente, este emagrecimento seja devido à infiltração dos parasitos na mucosa do aparelho digestivo, ou devido ao desequilíbrio protéico que induz a uma albuminúria (ADLER, 1964; CATARSINI, 1981).

Em 55% dos cães oligossintomáticos estudados foi observada uma onicogribose acentuada, assim como, em 100% dos cães sintomáticos. Concordando

com os relatos de Alencar (1959) que encontrou em suas pesquisas com leishmaniose canina cães apresentando unhas longas e curvas.

5.2. Resposta humoral x avaliação clínica

A resposta imune humoral dos cães foram avaliadas pelos testes de RIFI e ELISA. Técnicas adotadas em nosso estudo que hoje já são amplamente utilizadas em estudos clínicos e epidemiológicos (GENARO et al., 1997).

Inicialmente os cães deste trabalho foram avaliados pela técnica de RIFI para seleção inicial e inclusão dos animais nos grupos de cães com LVC (sintomáticos, assintomáticos e sorologicamente negativos). O ELISA foi o método utilizado para confirmar a infecção por *L.chagasi* e verificar a capacidade prognóstica do antígeno em cães com diferentes formas clínicas.

Os perfis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* apresentados pelos cães naturalmente infectados variaram conforme a forma clínica da doença apresentada por cada grupo clínico (Tabela 2).

Tabela 2: Reatividade sorológica de IgG em soros dos cães naturalmente infectados dos grupos I, II e III.

MÉTODO SOROLÓGICO	REATIVIDADE SOROLÓGICA		
	GRUPOS CLÍNICOS		
	G I (n=20)	G II (n=20)	G III (n=20)
ELISA	0,44 ± 0,21 ^a	0,23 ± 0,08 ^b	0,037 ± 0,007 ^c

Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Os resultados do ELISA (cut off = 0,09) estão apresentados como médias das densidade óptica (nm) ± desvio padrão; n= número de animais. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente entre si.

As análises estatísticas entre os grupos demonstraram que a reatividade sorológica média de todos os grupos de cães portadores de LVC (GI, GII) foi superior àquela observada no GIII (cães não infectados). Com os resultados obtidos pelo ELISA

nos permitiu diferenciar os grupos de cães com LVC, evidenciando que a reatividade de IgG total do grupo I foi significativamente maior à média da reatividade sorológica observada no grupo II, (Tabela. 2).

Os cães do grupo I apresentaram reatividades sorológicas bastante elevadas ($0,44 \pm 0,21$) ao teste de ELISA em relação ao grupo II ($0,23 \pm 0,08$), resultados considerados estatisticamente significativos ($p= 0,00004$). Os resultados comparativos das absorbâncias médias entre os grupos I e grupo III; grupo II e grupo III também foram considerados estatisticamente significativos ($p=0,000\dots$). Nossos resultados corroboram com as pesquisas de Badaró et al. (1996) os quais utilizaram ELISA como teste diagnóstico para Leishmaniose Canina, demonstrou uma sensibilidade de 99% de especificidade e um excelente poder preditivo em casos suspeitos de calazar canino.

Quando comparamos estatisticamente os resultados da RIFI e do ELISA constatamos 100% de concordância entre os dois testes, evidenciando que a RIFI é um bom teste de imunodiagnóstico para leishmaniose canina.

Segundo Abranches et al. (1991) os níveis de anticorpos específicos aparecem a partir de 1,5 a 3 meses após a infecção experimental. Entretanto, neste trabalho, não foi possível fazer o acompanhamento da evolução clínica e sorológica dos cães, uma vez que todos os cães desta pesquisa eram adultos.

Quando comparamos os resultados clínicos com os resultados das avaliações sorológicas entre os grupos, observamos que a ocorrência das sintomatologias clínicas está ligada aos níveis de anticorpos produzidos.

Os animais do grupo I, com sintomatologia severa da doença como lesões generalizadas, emagrecimento, alopecia generalizada dentre outros sintomas a reatividade sorológica média significativamente superior quando comparados ao grupo II de cães oligossintomáticos. Diante desse achado, podemos afirmar que à medida em que os sinais clínicos aumentam ou aparecem, os níveis de anticorpos tendem a serem mais elevados.

Neste trabalho, demonstramos através de ELISA um elevado valor preditivo e uma correlação significativa entre as absorbâncias do ELISA e o número de sinais clínicos apresentados pelos cães avaliados, sendo maior nos cães sintomáticos. Estes resultados concordam com os de Borja-Cabreira et al. (1999), Pinelli et al. (1994), Genaro et al., (1992) em trabalhos com animais experimentalmente infectados com *L. chagasi* onde foi demonstrado que os animais que apresentavam sinais clínicos os títulos de anticorpos eram maiores. O mesmo descrito em cães naturalmente infectados

por *L. chagasi* na Turquia por Ozensoy et al. (1998). Por outro lado pesquisas mostram que em cães infectados com *L. chagasi* os níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* estão frequentemente elevados, muito antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos (HOMMEL et al., 1995), e começam a cair quatro meses após intervenção terapêutica (ALVAR et al., 1984).

Em área endêmica é muito comum o encontro de numerosos cães assintomáticos soropositivos. 90% dos cães assintomáticos dessas áreas desenvolvem a infecção e evoluem para a forma oligossintomática e posteriormente para a sintomática em um período que pode ser longo (ALENCAR, 1959; LANOTTE et al., 1979). Apesar da cidade de São Luís ser considerada endêmica para leishmaniose canina, não se utilizou neste trabalho grupo de cães assintomáticos, haja vista que os cães com sorologia positiva capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de São Luís apresentavam algum sinal clínico sugestivo de leishmaniose. Entretanto sabemos que estes existem em grande número, porém, há muitas vezes, a dificuldade dos profissionais Médicos Veterinários e funcionários do Ministério da Saúde na identificação e captura destes.

Estudos mostram que na infecção assintomática ou subclínica há um equilíbrio na relação parasito-hospedeiro (OLIVEIRA et al., 1993). Através de 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).

5.3. Histopatologia

Ao exame histopatológico da pele dos cães dos grupos I e II avaliados pela técnica de Hematoxilina & Eosina observou-se na epiderme a presença de hiperqueratose, que variava de acentuada a discreta, acantose geralmente acentuada e em alguns casos vacuolização da membrana basal. Na derme se observa um infiltrado inflamatório difuso constituído principalmente por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos em menor quantidade, macrófagos e em alguns casos mastócitos. Nos animais do grupo I (cães sintomáticos) o infiltrado inflamatório era mais intenso, com a presença de formas amastigotas do parasita no interior dos macrófagos, formando clareiras macrofágicas na derme e áreas de necrose (Figuras 3A, 3B). Enquanto o grupo II (cães oligossintomáticos) apresentou infiltrado inflamatório menos intenso com presença de parasitas em menor quantidade (Figuras 3C, 3D).

Grandes quantidades de neutrófilos foram observadas no infiltrado inflamatório da pele dos cães dos grupos I e II, o que está diretamente relacionada com o parasitismo dos animais, conforme citações de pesquisas mostrando que nas leishmanioses os neutrófilos participam da fase inicial da infecção, controlando o crescimento parasitário. Confirmando-se este fato, camundongos submetidos à depleção de neutrófilos apresentaram uma carga parasitária 12 vezes maior no baço; no fígado, no entanto, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Por outro lado, outros estudos mostram que os neutrófilos contribuem efetivamente para o desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c (TACCHINI-COTIER et al. 2000).

Segundo Rosseau et al. (2001), estas lesões são decorrentes da produção de enzimas lisossomais: mieloperoxidase, lisosima, elastase, catepsinas, proteinases, colagenase, gelatinase, fosfatase alcalina, dentre outras, no esforço de combater o agente infeccioso. Baseado nesta afirmativa significaria pode-se dizer que as enzimas produzidas pelos neutrófilos poderiam estar envolvidas no processo de degradação da matriz extracelular da pele dos cães estudados neste trabalho, associado à degradação induzida pelo parasita. Por outro lado, de acordo com os achados neste trabalho presume-se que a participação dos neutrófilos na pele tenha também função fagocítica, concordando com estudos *in vitro* e ultra-estruturais que demonstram que os neutrófilos são capazes de fagocitar e matar promastigotas de *L. infantum*.

Os linfócitos T constituem a maior população linfocítica do sangue periférico e sendo encontrados também no baço, linfonodos e placas de Peyer. Estas células

expressam em suas membranas, moléculas de superfície denominadas grupos de antígenos que diferenciam populações de linfócitos (CD = *cluster differentiation*). Existem centenas já documentados, sendo que os mais pesquisados são CD4⁺ e CD8⁺. Pesquisas mostram que essas moléculas são extremamente importantes na imunopatologia da leishmaniose tegumentar murina (TITUS et al., 1987), influenciando na resistência ou susceptibilidade à *L. (L.) major* conforme descrito por pesquisadores (TITUS et al. 1987; LIEW et al. 1991).

De acordo com estudos feitos por Convit et al. (1972) e Akufo et al. (1997) os fatores que influenciam o aparecimento de um tipo ou outro de lesão estariam ligados não somente ao parasita, mas também ao hospedeiro no que se refere ao desenvolvimento ou não de uma resposta imune eficaz e bem modulada, capaz de controlar a infecção. Embora, neste trabalho não foram quantificados os tipos de linfócitos-T presentes na pele dos cães dos diferentes grupos, a presença em menor ou maior intensidade de linfócitos encontrada nas lesões da pele dos cães infectados dos grupos G I e G II poderia indicar que ela estaria relacionada à imunomodulação da infecção. Podendo-se sugerir que nos animais dos grupos I e II não houve produção de uma resposta imune eficaz para combater a infecção, e isto pode estar relacionado à polarização dos linfócitos T CD4⁺ com a indução de uma resposta do tipo Th2. A este respeito, pesquisas desenvolvidas por Mosman & Coffmann (1986) demonstraram a existência de sub-populações de células T CD4⁺ (Th1 e Th2), sendo que a progressão da infecção estaria relacionada com uma resposta do tipo Th2 e a resistência à mesma estaria associada a uma resposta do tipo Th1 (LOCKESLEY et al., 1987; HEINZEL et al., 1989).

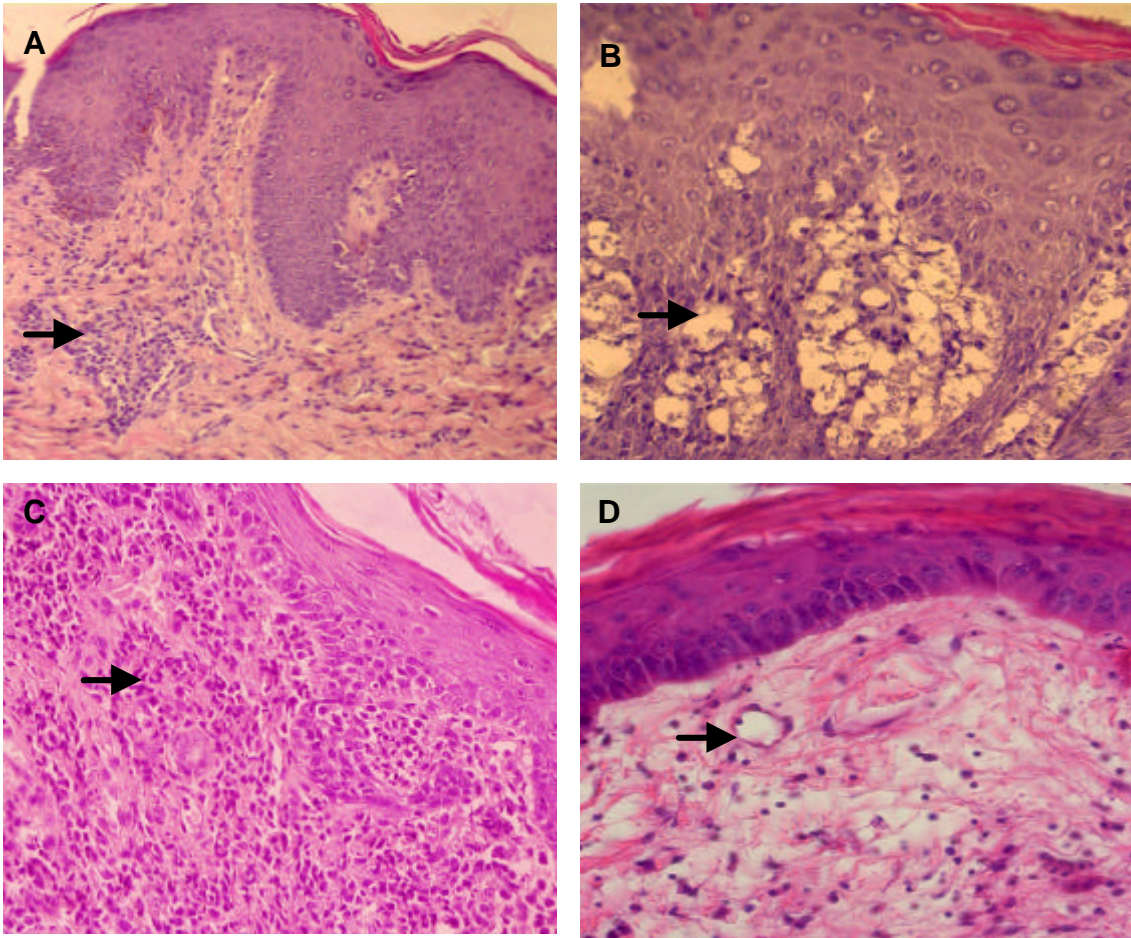


Figura 3: Pele de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. A- Pele de cão sintomático do grupo I apresentando intenso infiltrado inflamatório (seta), 260X; B- presença de formas amastigotas do parasita no interior de macrófagos (seta), 460X; C - Pele de cão oligossintomático do grupo II apresentando infiltrado inflamatório (seta), 420X; D- Presença de parasitas em menor intensidade (seta), 460X. Coloração H&E.

5.4. Detecção de *Leishmania in situ* pela técnica de Imunoperoxidase Indireta em pele incluída em parafina

Os fragmentos de pele dos cães dos grupos I, II e III incluídos em parafina e analisados seguindo a técnica de Imunoperoxidase Indireta utilizando o kit de diagnóstico Catalyzed Signal Amplification System Peroxidase (CSA/ K1500, DAKO®) possibilitou comprovar a presença das formas amastigotas de *Leishmania in situ* (Figura 4), permitindo assim um diagnóstico seguro da doença, indicando que o anticorpo primário policlonal, o qual é produzido em camundongo, mostrou-se eficiente na marcação dos parasitas na pele dos animais infectados. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Tafuri et al. (2004) que também trabalharam com métodos imunohistoquímicos para detecção de formas amastigotas em tecidos de cães. Estes mesmos autores sugerem que o anticorpo poderia ser substituído pelo soro hiperimune de cão ou de humano obtendo-se assim o mesmo resultado a custos mais baixos.

A ineficácia do diagnóstico histopatológico de leishmaniose pode ser devido à baixa especificidade dos métodos histológicos tradicionais para detecção do parasita. Por outro lado, os métodos imunohistoquímicos para identificação de *Leishmania* em amostras de tecidos são simples, não precisam de equipamentos especiais e são altamente sensíveis e específicos. Este fato ficou claramente comprovado no presente trabalho uma vez que a técnica de imunoperoxidase indireta confirmou que na pele de todos os cães do grupo I houve um parasitismo mais acentuado que no grupo II. Diferentemente do que foi observado quando se utilizou a coloração de Hematoxilina & Eosina, em que não foi possível observar a presença de parasitas no tecido cutâneo de alguns animais dos grupos I e II principalmente nos animais do grupo II, que por serem oligossintomáticos apresentavam baixa carga parasitária, o que também está de acordo com Ferrer et al. (1988) que afirmaram que em tecidos corados com Hematoxilina & Eosina, as análises histológicas frequentemente fracassam na detecção de amastigotas de *Leishmania*.

Ainda, Bourdoiseau et al. (1997) e Tafuri et al. (2004) relataram que em pele tem-se obtido um aumento de 50% de positividade pela técnica imunoperoxidase indireta em relação ao método de Hematoxilina e Eosina o que permite inferir que este método imunohistoquímico é adequado para o diagnóstico de *Leishmania* constituindo-se também numa ferramenta valiosa para o entendimento da patogênese da LVC.

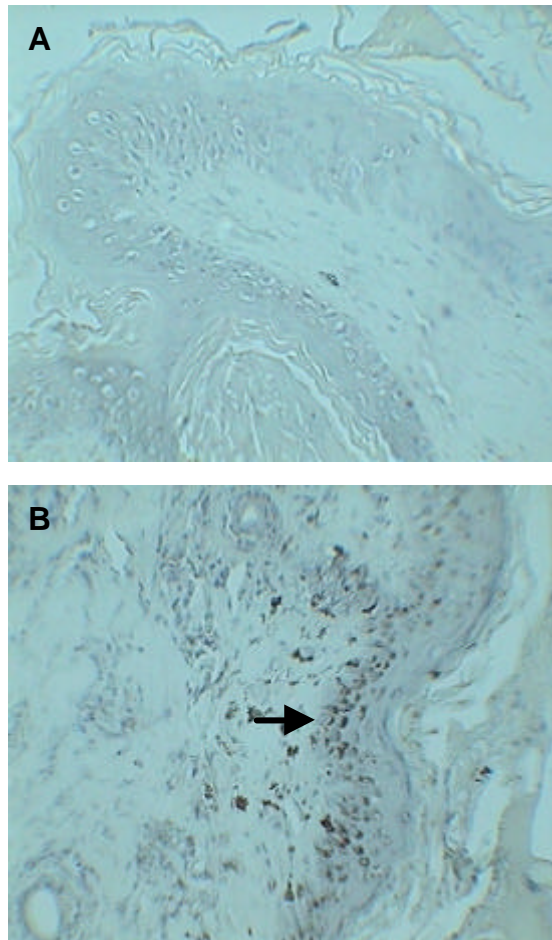


Figura 4: Pele de cão do grupo III, não infectado (A); pele de cão do grupo I, cão sintomático, mostrando a detecção de amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos, Imunoperoxidase indireta, 200X.

5.5. Análises da Matriz Extracelular

Sistema Colágeno

Os resultados da avaliação do sistema colágeno da pele dos animais dos grupos I, II e III avaliados pela técnica Sirius Red sob luz polarizada para os colágenos tipo I e III e pela Reticulina de Gordon & Sweets para fibras reticulares (colágeno do tipo III) mostraram que nos animais do grupo I, que apresentaram um intenso infiltrado inflamatório, áreas de necrose e presença abundante de formas amastigotas, houve predominância de colágeno do tipo III, caracterizando-se pela presença de fibras mais delgadas, menos birrefringentes, visualizadas nas cores verde (Figura 5B) e, em menores quantidades, observou-se a presença de colágeno do tipo I (Figura 5C), componente da arquitetura normal da pele. Estes dados comprovam a severa alteração do tecido cutâneo destes animais com perda da arquitetura normal do tecido decorrente do quadro clínico da doença.

As intensas alterações ocorridas na matriz extracelular mostram evidências de que as leishmanias utilizam as fibras de colágeno, principalmente o colágeno do tipo I para se evadirem da resposta imune e migrarem para outros órgãos do hospedeiro. Esta interação é um fenômeno importante para a patogênese da infecção, e poderia explicar o tropismo específico do parasita para a pele, uma vez que o colágeno é o componente mais abundante da matriz extracelular.

Provavelmente este fenômeno seja devido ao fato que o parasita apresente receptores para o colágeno do tipo I, a semelhança do que já foi demonstrado para a *Leishmania mexicana*, o que permite que estas penetrem na matriz do tecido conjuntivo da derme, antes de serem fagocitadas pelos macrófagos (LIRA et al., 1997).

Ainda nos cães do grupo I, a predominância de colágeno do tipo III foi confirmada pela técnica da Reticulina de Gordon e Sweets na qual se observou que as fibras reticulares apresentavam-se mais espessas nas áreas de intenso infiltrado inflamatório e onde havia presença do parasita. Nestas áreas, as fibras se distribuíam abundantemente tanto na derme papilar quanto na derme reticular. Também se observaram dispostas em torno dos macrófagos parasitados (Figuras 6B, 6C). Esta predominância de colágeno do tipo III na pele dos animais infectados mostra o papel de suporte deste tipo de colágeno nas áreas de infiltrado inflamatório, onde há histiócitos vacuolizados e parasitados. Estes dados concordam com os achados de Abreu-Silva et

al. (2004) que observaram a predominância do colágeno tipo III em tecido cutâneo na fase mais avançada da infecção experimental por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c.

Gonçalves et al. (2003), trabalhando com cães naturalmente infectados com *L. chagasi* com um quadro de pneumonite intersticial crônica, demonstraram a presença abundante de fibras reticulares (colágeno tipo III) no interior dos septos alveolares. Estas se apresentavam profundamente coradas e formavam estruturas densas emaranhadas. O predomínio das fibras reticulares foi observado nas áreas onde o infiltrado inflamatório era mais intenso e onde o septo pulmonar apresentava-se mais espesso quando comparado com os pulmões dos animais controle normais. À semelhança do que foi reportado por esses autores, no presente trabalho, também foi observado na pele dos cães naturalmente infectados, grupos I e II, predominância de fibras reticulares nas áreas onde havia maior intensidade do infiltrado inflamatório associado à presença do parasita.

Os animais do grupo II, cães oligossintomáticos com lesões de pele, que apresentaram infiltrados inflamatórios com presença de parasitas em quantidades reduzidas em relação ao grupo I, mostraram também a predominância de fibras colágenas do tipo III associadas à presença de colágeno do tipo I (Figura 5D). As fibras reticulares neste grupo apresentavam-se menos espessas e com menor intensidade de deposição (Figura 6D).

A pele dos cães não infectados (G III) apresentou predominância de colágeno do tipo I, mostrando fibras mais espessas com maior birrefringência, visualizadas ao microscópio sob luz polarizada em vermelho (Figura 5A). As fibras reticulares (colágeno do tipo III) deste grupo apresentavam-se mais delicadas com uma distribuição homogênea na derme (Figura 6 A).

A predominância percentual média do colágeno tipo III na pele dos animais sintomáticos do grupo I ($79,5 \pm 10,0$) e oligossintomáticos do grupo II ($61,7 \pm 12,9$) em relação aos animais do grupo III ($5,5 \pm 1,6$), animais não infectados, evidencia o alto grau de alteração da matriz colagenosa nos animais do grupo I e II, quando comparados com a expressão média no grupo III (Tabela 3), resultados considerados estatisticamente significativos ($p < 0,01$).

Estes resultados estão de acordo com os de Abreu-Silva et al. (2004) que trabalhando com infecção experimental em várias linhagens de camundongos com cepas de *L. amazonensis* e utilizando a técnica histoquímica Sirius-Red sob luz polarizada

observaram que na fase inicial da infecção havia predominância do colágeno tipo I na lesão cutânea primária dos animais. Ainda constataram que o mesmo tipo de colágeno era observado no tecido cutâneo nos animais não infectados. Entretanto, observaram que com o decorrer da infecção havia um decréscimo gradual deste tipo de colágeno sendo substituído pelo colágeno tipo III. Esses mesmos autores demonstraram que essas mudanças eram mais evidentes nos animais mais susceptíveis, camundongos BALB/c, principalmente quando apresentavam lesões contendo intenso infiltrado inflamatório, constituído por macrófagos altamente parasitados com leishmania, culminando com a perda da arquitetura normal da derme.

Essas modificações da matriz extracelular também foram muito evidentes nos animais dos grupos I e II embora no presente estudo não tenha sido feito acompanhamento da dinâmica do aparecimento das lesões cutâneas, visto que os animais eram naturalmente infectados. Então, estes resultados sugerem que a patogênese das lesões intersticiais seriam influenciadas pelo tipo de infiltrado inflamatório e pela presença do parasita na pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania*.

Tabela 3. Valores percentuais médios do colágeno do tipo III observado na pele dos cães dos grupos I, II e III através da técnica histoquímica Sirius Red sob luz polarizada.

GRUPOS CLÍNICOS		
G I (n=20)	G II (n=20)	G III (n=20)
79,5 ± 10,0 ^a	61,7 ± 12,9 ^b	5,5 ± 1,6 ^c

Resultados das porcentagens do colágeno tipo III apresentados como média ± desvio padrão. Os resultados estão apresentados como média das porcentagens obtidas do colágeno do tipo III ± desvio padrão; n= número de animais. Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente entre si.

A predominância de colágeno do tipo III nos cães naturalmente infectados com *L. chagasi* também foi constatada em lesões granulomatosas hepáticas em camundongos infectados com *Leishmania donovani*, diferentemente do que tem sido observado em granulomas hepáticas induzidos por *Schistosoma mansoni* em que o

colágeno do tipo III é substituído por colágeno do tipo I, com a finalidade de preservar a integridade estrutural do granuloma (LEITE & CROFT et al., 1996; GOSH et al., 1997). Ainda, em estudos da matriz extracelular de neoplasias mamárias benignas e malignas em cães, utilizando o método histoquímico Sirius Red sob luz polarizada, Martins et al. (2002) constataram a predominância de colágeno do tipo I em tumores benignos, enquanto que nos carcinomas havia predominância de colágeno do tipo III.

Levando em consideração os resultados das pesquisas acima referidas, assim como aqueles demonstrados neste trabalho, quando se compara a pele dos animais não infectados com a dos infectados dos grupos I e II, se confirma que o colágeno do tipo I é constitutivo da arquitetura tecidual e que após agressão ele é modificado para o tipo III com a finalidade de reconstrução tecidual.

Ao se relacionar a reatividade sorológica média avaliada pela RIFI e ELISA, com os achados clínicos e com as alterações da matriz extracelular nos animais dos grupos I, II e III (Tabela 2), se demonstra que as alterações da matriz extracelular estão intimamente ligadas ao perfil clínico e sorológico do animal, ou seja, quanto maior a reatividade sorológica mais intensa é a manifestação clínica da doença, conseqüentemente a matriz extracelular mostra-se mais alterada.

Assim, os resultados deste estudo enfatizam as profundas alterações estruturais dos componentes colagenosos da matriz extracelular da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*.

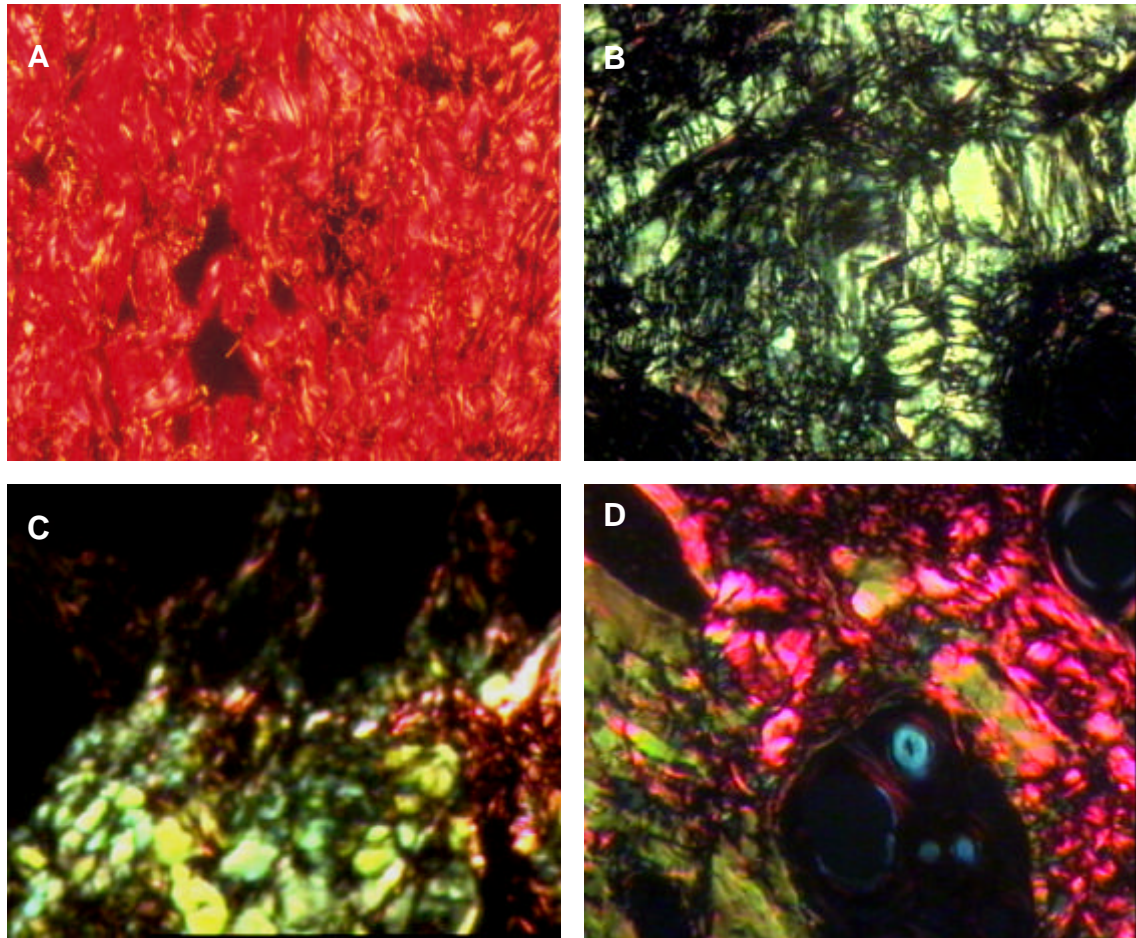


Figura 5: A- Pele de cão não infectado, grupo III, apresentando predominância de fibras colágenas fortemente birrefringentes, (colágeno tipo I), marcado em vermelho. B e C - Pele de cão sintomático do grupo I apresentando predominância de fibras colágenas do tipo III, menos birrefringentes marcadas em verde. D- Pele de cão oligosintomático do grupo II, mostrando a presença de fibras colágenas tanto do tipo I (em vermelho) quanto do tipo III (em verde). Lâminas A, B, C e D, Sírius Red, sob luz polarizada. 450X.

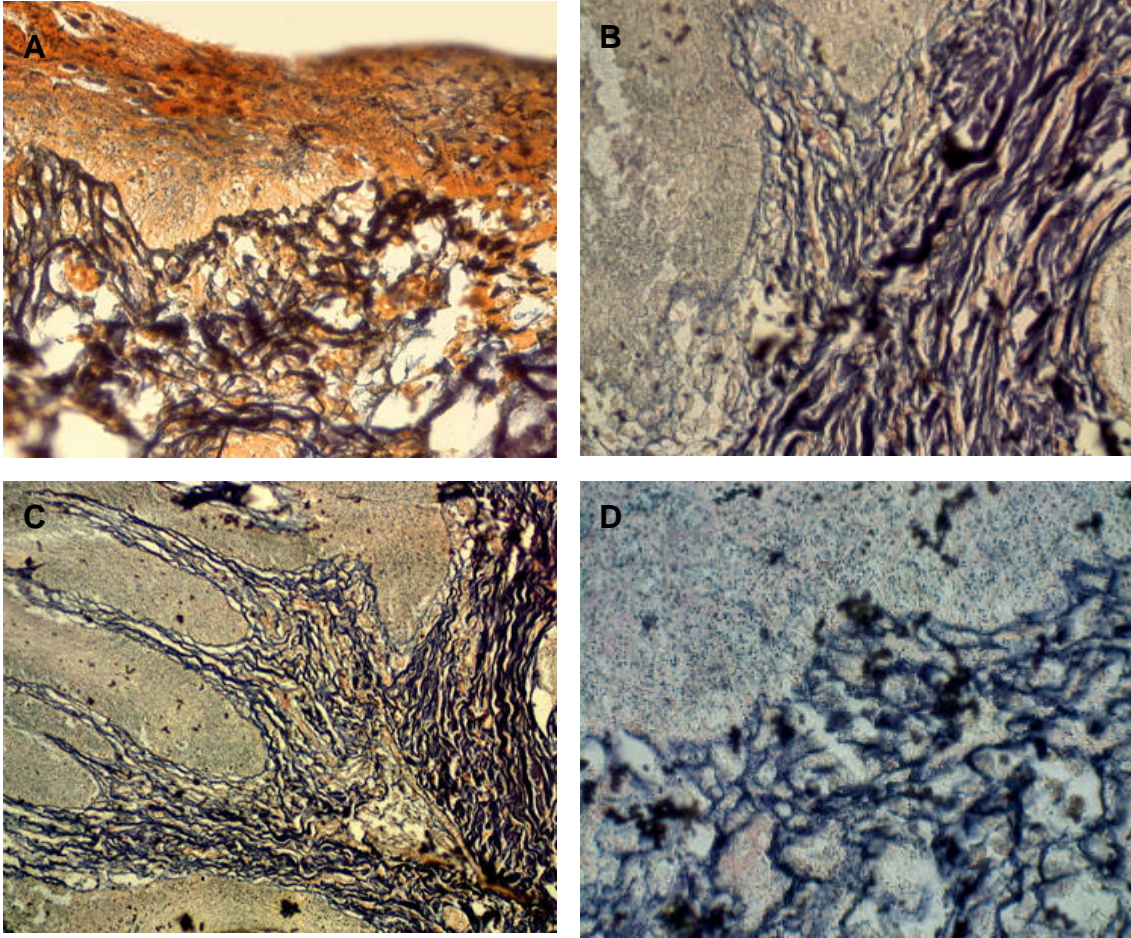


Figura 6: A- Pele de cão não infectado, grupo III, apresentando padrão de fibras reticulares normalmente distribuídas na derme. B e C- Pele de cão sintomático do grupo I, fibras reticulares distribuídas desuniformemente, e em maior quantidade. D- Pele de cão oligosintomático do grupo II, fibras reticulares desuniformes e, em menor quantidade. Reticulina de Gordon and Sweets. 440X.

Sistema Elástico

A pele dos cães do grupo I apresentou fibras elásticas distribuídas irregularmente, mais espessas e em maior quantidade (Figura 7D) em relação ao grupo controle (G-III). Estas observações foram mais evidentes nas áreas de intenso infiltrado inflamatório associado à presença do parasita no interior dos macrófagos, o que sugere que a proliferação das fibras elásticas acontece com o intuito de manter a arquitetura normal da pele e dar início à remodelação pós-injúria.

No grupo II, estas fibras apresentavam-se ainda com padrão de normalidade, com discreto espessamento (Figuras 7B e 7C) em relação ao grupo I onde as fibras elásticas eram mais delgadas e se distribuíam de maneira uniforme em toda derme (Figura 7A).

Não há dados na literatura, até o momento, que relatam alterações teciduais do sistema elástico em infecções experimentais ou naturais com *Leishmania* ou outros protozoários intracelulares obrigatórios.

No entanto, as alterações e a proliferação das fibras elásticas na pele dos animais dos grupos I e II em relação aos animais controle são semelhantes às que foram evidenciadas por Martins et al. (2002) em neoplasias mamárias benignas e malignas em cães, nas quais verificaram o predomínio desordenado dessas fibras nos tumores malignos, principalmente na pseudocapsula e ao redor de ácinos e túbulos.

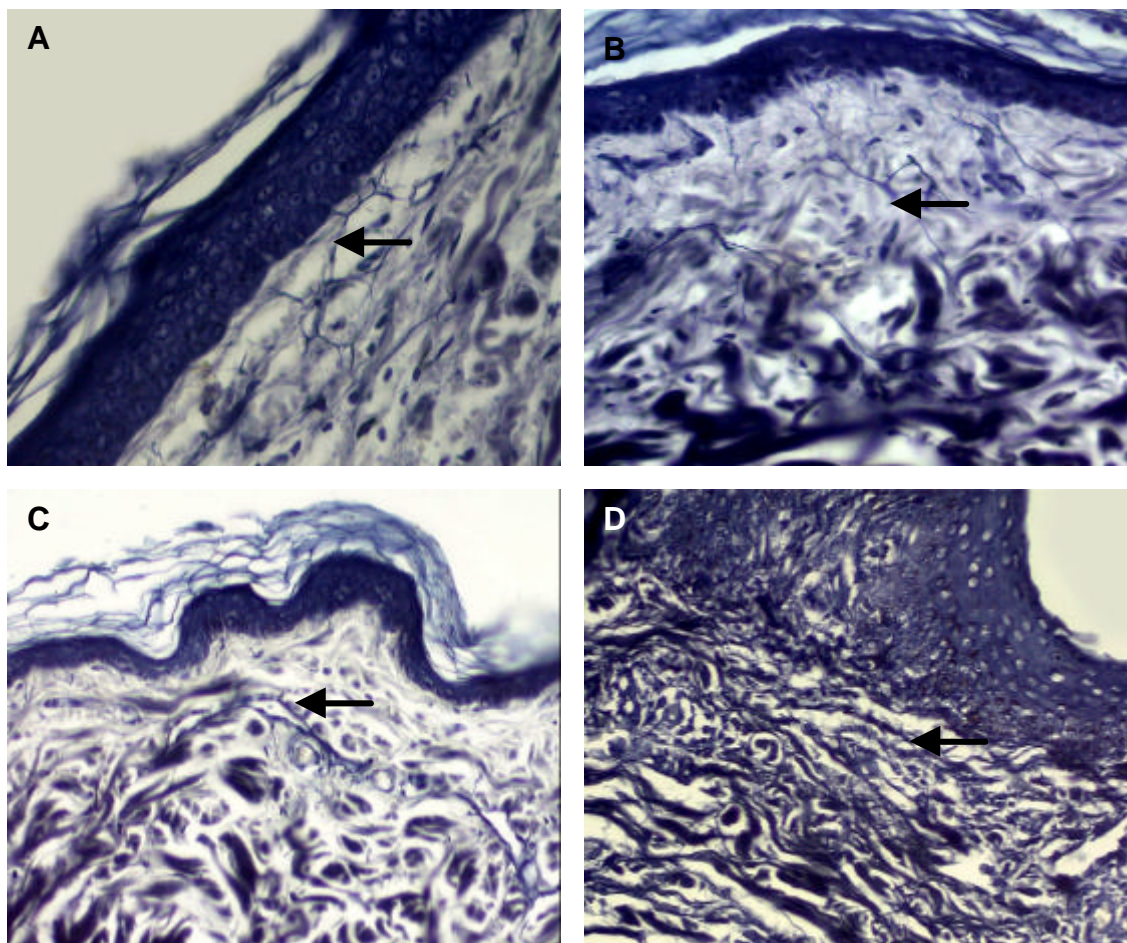


Figura 7: A- Pele de cão do grupo III, não infectado apresentando fibras elásticas em padrão normal (seta), 460X. B e C - Pele de cão oligossintomático do grupo II, fibras elásticas apresentando padrão de normalidade com discreto espessamento (seta), 460X. D- Pele de cão sintomático do grupo I, fibras elásticas distribuídas irregularmente, apresentando espessamento evidente (seta), 430X. Verhoeff.

Fibronectina

A expressão da fibronectina na pele dos animais sintomáticos (grupo I) demonstrou que ela diminuiu consideravelmente (Figuras 8B, 8C), principalmente nas áreas ricas em parasitas e infiltrado inflamatório, quando comparada com a expressão dela nos animais não infectados (grupo III) (Figura 8A), à semelhança do que foi demonstrado por Abreu-Silva et al. (2004) em camundongos experimentalmente infectados com *L. amazonensis*. Estes resultados demonstram que há uma severa degradação das moléculas adesivas constitutivas da pele como a fibronectina levando a sua diminuição. Estudos comprovam que as formas amastigotas de leishmania poderiam estar diretamente envolvidas na degradação dos componentes da matriz extracelular (McGWIRE et al., 2003).

RIZVI et al. (1988) sugeriram que o receptor de membrana gp63 encontrado na superfície do parasita é considerada uma molécula semelhante a fibronectina, possuindo características biológicas e moleculares semelhantes à fibronectina, facilitaria a inativação do complemento. Este fato explica a facilidade do parasita *Leishmania* em interagir com as células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro, sobrevivendo no fagolisossoma e,ou, aderindo-se a moléculas de adesão, tais como a fibronectina para então estabelecer a infecção e migrar para outros órgãos. Isto pode levar a degradação ou esgotamento dos constituintes da matriz causando alterações conforme as que foram observadas na pele dos animais infectados.

O papel potencial da fibronectina na patogênese das alterações da matriz extracelular foi sugerido por Wyler et al. (1985) ao constatarem experimentalmente que o uso de anticorpos policlonais anti-fibronectina inibiam a adesão do parasita *Leishmania* às células do hospedeiro, evidenciando o papel da fibronectina na adesão parasitária.

Através da microscopia confocal utilizada neste trabalho se observou a interação da fibronectina com parasitas na pele dos animais infectados demonstrando a importância dessas fibras, como já evidenciada em trabalhos com *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* comprovando que estes protozoários prendem-se à fibronectina do hospedeiro facilitando sua associação com as células fagocíticas, permitindo o processo de migração do parasita (WYLER, 1987).

Ainda, Wyler (1987) comprovou que *Entamoeba histolytica* e *Schistosoma* spp. produzem proteases que degradam as diversas isoformas da fibronectina e de outras

proteínas da matriz através da liberação de cisteínas-proteases, presumivelmente facilitando a penetração na barreira da mucosa intestinal, podendo-se inferir com isso que a degradação da fibronectina observada na pele dos animais infectados nesta pesquisa, pode ser devido à ação de proteases.

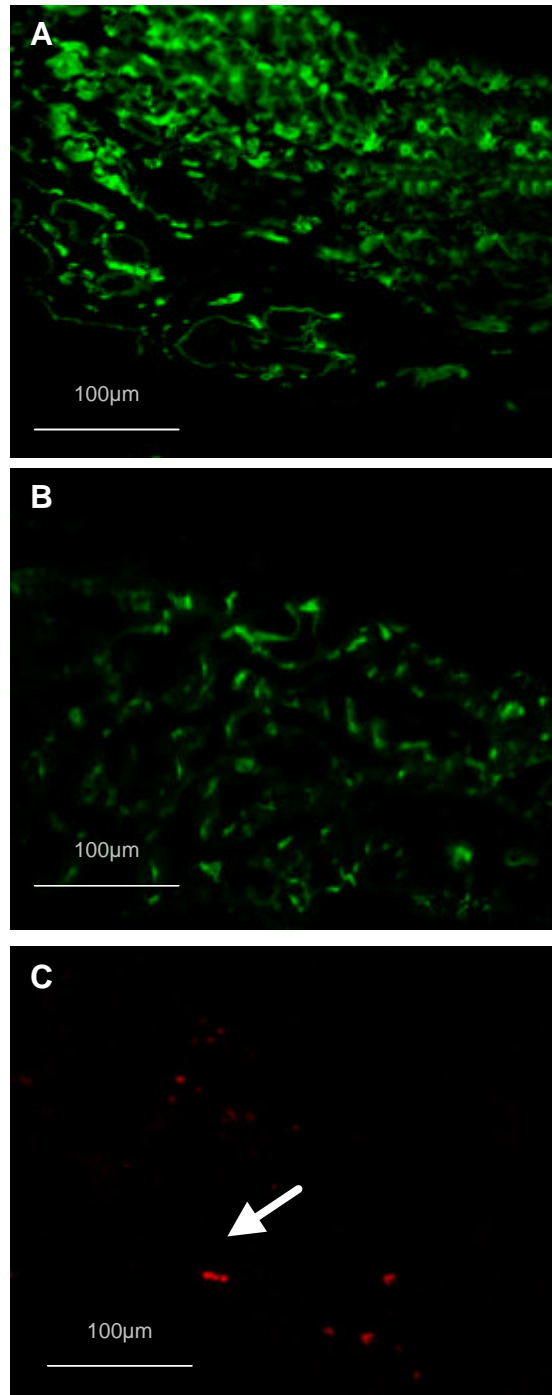


Figura 8: Análises em microscopia confocal. A - Fibronectina normal em pele de cão do grupo controle negativo (G III). B - Diminuição de fibronectina em pele de cão infectado (G I) (em verde, FITC). C - Parasitas marcados com CY-3 em vermelho (seta), em pele de cão do grupo I do mesmo corte apresentado em B.

Laminina

Comparando-se a expressão da laminina na pele dos cães do grupo sintomático, (grupo I) com os animais não infectados (grupo III), observou-se um decréscimo da expressão nos animais do grupo I (Figura 9B) em relação aos animais do grupo III (Figura 9A), demonstrando-se também que há degradação da laminina nas áreas de parasitismo em associação com reação inflamatória. Estes resultados são diferentes daqueles encontrados por Abreu-Silva et al. (2004) que não observaram alterações evidentes na expressão da laminina, tanto na pele quanto nos linfonodos dos camundongos infectados experimentalmente com cepas de *L. amazonensis* quando comparados com os controles não infectados.

Estudos realizados por Gosh et al. (1999) identificaram, isolaram e caracterizaram uma proteína de superfície de *L. donovani*, a qual se liga fortemente à laminina, maior glicoproteína da matriz extracelular e da membrana basal, comprovando o envolvimento desta molécula de adesão nos processos de estabelecimento de infecção e migração do parasita. Este fato pode explicar as alterações que foram observadas nessas fibras na pele dos animais naturalmente infectados deste trabalho.

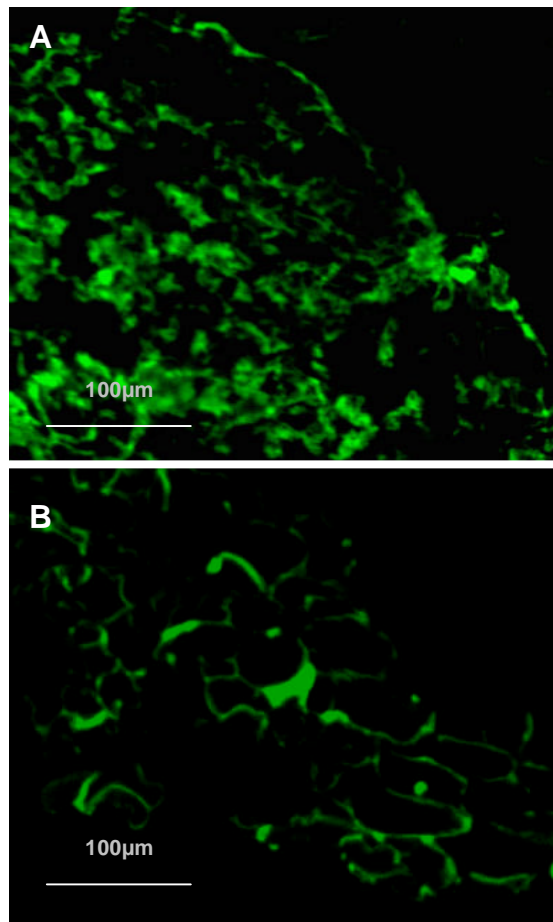


Figura 9: Análises em microscopia confocal. A - Laminina normal em pele de cão do grupo controle negativo (G III). B - Diminuição de laminina em pele de cão infectado (G I) (em verde, FITC).

6 – CONCLUSÕES

- As alterações teciduais estão diretamente relacionadas à carga parasitária, ao perfil clínico e sorológico dos animais.
- O tipo de infiltrado inflamatório e a presença do parasita estão diretamente relacionados às alterações teciduais.
- As análises de matriz extracelular da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* mostram que ocorrem alterações severas no sistema colágeno as quais o colágeno tipo I é substituído pelo colágeno do tipo III.
- Componentes da matriz extracelular podem estar envolvidos na patogênese da leishmaniose canina, conferindo um tropismo específico do parasita pela pele, onde o colágeno é o componente mais abundante da matriz extracelular.
- Com o aumento dos sinais clínicos da doença se podem observar alterações mais intensas na matriz extracelular da pele.
- A fibronectina e a laminina, proteínas não colagenosas da matriz extracelular da pele, apresentam expressão reduzida em animais naturalmente infectados com *L. chagasi*.
- A detecção de *Leishmania* em biópsias de pele pela técnica de imunoperoxidase indireta é uma ferramenta eficaz e acessível, possibilitando maior segurança no diagnóstico de leishmaniose.

7 – PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar Classes e subclasses de imunoglobulinas em cães naturalmente infectados com diferentes formas clínicas da LVC relacionando-as com as alterações da MEC.
- Avaliar as alterações de matriz extracelular em outros órgãos, como linfonodos, baço, rins, sistema nervoso central dentre outros.
- Evidenciar a participação das moléculas de adesão fibronectina, laminina em outros órgãos.
- Investigar o papel específico do colágeno do tipo I na infecção, adesão e migração do parasita.
- Investigar proteases produzidas pelo parasita leishmania responsáveis pela degradação da matriz extracelular nos diferentes tecidos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G. M. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 537-550, 1991.

ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G. M. Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. **Acta Medica Portuguesa**, v. 11, p. 871-875, 1998.

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

ADLER, S. *Leishmania*- In Advances in parasitology. Vol 2 (B. Dawes, ed) Academic Press, New York, p. 35-96, 1964.

AKUFFO, H.O.; MAASHO, K.; BLOSTEDT, M.; HÖJEBERG, B.; BRITTON, S.; BAKHIET, M. *Leishmania aethiopia* derived from diffuse leishmaniasis patients preferentially induce mRNA for IL-10 while those from localized leishmaniasis patients induce IFN- γ . **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p. 737-741, 1997.

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

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.D.; BÓGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SAINZ, A.; ESCACENAS, C. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **American Tropical Medicine Parasitology**, v. 88, p. 371-378, 1984.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M.C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, C.; MADUREIRA, C.; BURNS, J.M.; HOUGHTON, R.L.; DAVID, J.R.; REED, S.G. A Cloned Antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 758-761, 1996.

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-finger like sequences. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1622-1629, 2002.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. Editora Manole. 2.ed. São Paulo, 629p. 1992.

BATES, P.A. The development biology of *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 215-218, 1994.

BEACHEY, E.H. Bacterial adherence adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **Journal of Infectious Diseases**, v. 143, p. 325-345, 1981.

BLACKWELL, J.M. Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. **Parasitology**, v. 104, p. 319-334, 1992.

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.

BORJA-CABREIRA, G.P.; DA SILVA, V.O.; DA COSTA, R.T; REIS, A. B.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; PALATINIK, C.B.S. The focose-manose ligand-ELISA in the prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 296-301, 1999.

BOS, D. J; KAPSENBERG, M. L. The skin immune system. **Immunology Today**, v. 7, p. 235-240, 1986.

BOTELHO, A.C.C., TAFURI, W.L., GENARO, O.; MAYRINK, W. Histopathology of human american cutaneous leishmaniasis before and after treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 1, p. 11-18, 1998.

BOURDOISEAU, G.; MARCHSL, T.; MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **Journal of Veterinary and Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 439, 1997.

BOUVIER, J.; ETGES, R.J.; BORDIER, C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 15504-15509, 1985.

BOUVIER, J.; ETGES, R.J.; BORDIER, C. Identification of promastigotes surface protease in seven species of *Leishmania*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 24, p. 73-79, 1987.

BRAY R.S.; ALEXANDER J. Leishmania and macrophages. In The leishmaniasis, Peters W, Killich-Kendrick (Eds) Academic Press, London. p. 211-234, 1987.

BRYCESON, A.D.M. Leishmaniasis. In Cook, G.C. (Ed), Manson's tropical diseases, WB Saunders, London. p. 1213-1245, 1996.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S.; SOUSA, J.C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, p. 173-180, 1998.

CALDINI, E.G.; CALDINI, N.; DE-PASQUALE, V.; STROCCHI, R.; GUIZZARD, S.; RUGGERI, A.; MONTES, G.S. distribution of elastic system fibres in the rat tail and its associated sheaths. **Acta Anatomica**, v. 139, p. 341-348, 1990.

CARDOSO, L. & CABRAL, M. Leishmania and canine leishmaniasis. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, XCIII (527): 122-141, 1988.

CARRASCO, F.H.; MONTES, G.S.; KRISTÁN, R.M.; SHIGIHARA, K.M.; CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L.C.U. Comparative morphologic and histochemical studies on the collagen of vertebrate arteries. **Blood Vessels**, v. 18, p. 296-302, 1981.

CARVALHO E.M.; BADARÓ R.; REED S.G.; JONES T.; JONHSON JR W.R. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, p. 2066-2069, 1985.

CATARSINI, O. Epidemiologia e manifestazione cliniche della leishmaniosi del cane. **Review Science Veterinary**, v. 44, p. 83-87, 1981.

CHER, D.J.; MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T cell clones. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **Journal of Immunology**, v. 38, p. 3688-3694, 1987.

CONVIT, J.; PINARDI, M.E.; RONDON, A. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 603-610, 1972.

COSTA, J.M.L.; VIANA, G.M.C.; SALDANHA, A.C.R.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; ALVIM, A.C.; BURATTINI, M.N.; SILVA, A.R. Leishmaniose visceral no Estado do Maranhão - Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, p. 321-324, 1995.

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

COTTA-PEREIRA, G.; IRUELA-ARISPE, M.L. Extracellular matrix: functional significance of oxytalan, elaunin and elastic fibers. **Clinical Biology Research**, v. 295, p. 101-107, 1989.

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F.G; BTTTENCOURT-SAMPAIO, S. Oxitalan, elaunin and elastic fibers in the human shin. **Journal Investigation of Dermatology**, v. 66, p. 143-148, 1976.

CUNHA, A.M. Infecções experimentais na Leishmaniose Visceral Americana. **Brasil Médico**, v. 2, p. 571, 1938.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, v. 7, p. 75-87, 1955.

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese, (Fac. Med. Univ. S. Paulo), Brasil, Ed. SNES, Rio de Janeiro, 162p., 1956.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brasil. Geographical distribution and Transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 49-212, 1962.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: Epidemiology and Public Health Aspects. **World Health Statistic Quarterly**, v. 45, p. 312, 1992.

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.

ESTERRE, P. DEDET, J. P.; GUERRET, S. ; CHEVALLIER, M. ; FRENAY, C. ; GRIMAUD, J. A. Matrix remodelling and fibroblast phenotype in early lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Pathology Research Practice**, v. 187, p. 924-930, 1991.

FEHER, H.M.; JENNINGS, J.; RANNIE, J. Histological study of fibrogenesis in experimental inflammation with especial referente to elastic tissue formation. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 52, p. 621-627, 1971.

FERREIRA, J.M.C.; CALDINI, E.G.; MONTES, G.S. Distribution of elastic system fibres in the peripheral nerves of mammals. **Acta Anatomica**, v. 130, p. 168-173, 1987.

FERRER, L.; RABANAL, R. ; FONDEVILLA, D. ; RAMOS, J.A. ; DOMINGO, M. Skin lesion in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Prattice**, v. 29, n. 1, p.389-396, 1986.

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

FERRER, L.M.; RABANAL, R.M; DOMINGO, M.. Identifications of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidases staining. **Review Veterinary Science**, v. 44, p. 194, 1988.

FUMMER, H.M.; SHEETZ, J.H.; NARKATES, A. J. Oxytalan connective tissue fibers: review. **Journal of Oral Pathology**, v. 3, p. 294-316, 1974.

FUNASA. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1988. Boletim epidemiológico da Fundação Nacional de Saúde- **FUNASA**, MS. Ano III, 1999.

GARTNER, L. P; HIATT, J.L. Color textbook of histology. W B Saunders Co, Philadelphia; 2nd ed., xii+ 592p, 2001.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, 1993. 202p (tese, doutorado, Parasitologia).

GENARO, O.; COSTA, C.A. da; BREYNER, E.T.; REIS, A. B.; SILVA, A. R.; TROPIA, M.R.J.; TAFURI, W.; DIAS, M.; MAYRINK, W. The course experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87 (suppl. II), p.105, 1992.

GENARO, O.; COSTA, R.T.; FRANÇA SILCA, J.C.; REIS, A.B.; SILVA, J.C.; VIEIRA, E.P. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis of dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi*, in Brasil. **Acta Parasitologica Turcica**, v.21, n.1, 1997.

GENARO, O.; MAYRINK, W.; MICHALICK, M.S.M.; DIAS, M.; COSTA, C. A da & MELO, M.N. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 43, 1988.

GHADIALLY, F.N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. Butterworth, London, xii+1261p, 1988.

GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L.; MELO, M.N.; RASO, P.; TAFURI, Wg. L. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. **Revista do Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 45, n. 3, p. 153-158, 2003.

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

GRIMALDI JR. G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, p. 230-250, 1993.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon- γ or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. **Journal Experimental of Medicine**, v. 177, p. 1505-1509, 1989.

HOMMEL, M. The genus *Leishmania*, Biology of the parasite and clinical aspects. **Bulletin of the Institute Pasteur**, v.75, p. 5-102, 1978.

HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, v. 86, (SI), p. 55-73, 1995.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 433p, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.; MONTES, G.S. Biology of collagen proteoglycan interaction. **Archive Histological Japanese**, v. 46, p. 589-629, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; MOURAO, P.A.; BONETTI, S.S.; Quantitation of collagen- proteoglycan interaction in tissue sections. **Connective Tissue Research**, v. 7, p. 91-96, 1980a.

JUNQUEIRA, L.C.U.; ZUGAIB, M.; MONTES, G.S.; TOLEDO, O.M.S.; KRIZTÁN, R.M. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 138, p. 273-281, 1980b.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd Dog-II. Pathology . **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 80-86, 1984a.

KEENAN, C.M.; HENDRICKS, L.D. LIGHTNER, L. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd Dog-I. Infection. Clinical Disease, and Clinical Pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 74-79, 1984b.

KEMP, M.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. The contrasting roles of CD4⁺ T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. **Immunology Today**, v. 17, p. 13-16, 1996.

KETTLE, D.S. *Psychodidae-Phlebotominae* (Sandflies). In KETTLE, D.S. (ed). Medical and veterinary Entomology. 2nd edition. CAB International, Wallingford: p. 612-637, 1995.

KILLICK-KENDRICK R. *Biology of Leishmania in phlebotomine sandflies*. In PETERS W, KILLICK-KENDRICK (Eds), The leishmaniasis and biology and medicine, Academic Press, London. p. 395-460, 1987.

KILLICK-KENDRICK R. The life-cycle of *Leishmania* in the sand fly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annals Parasitology Human Comparative**, v. 65 (suppl.I), p. 39-43, 1990.

LAINSON, L.; SHAW, J.J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Journal Brazilian Association Advances Sciences**, v. 44, p. 94-106, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Taxonomy of the New World *Leishmania* species. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 943-944, 1972.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, p. 595-599, 1978.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In. W. PETERS, R. KILLICK-KENDRICK. The leishmaniasis in Biology and Medicine; London, Academic Press, v. 1, p. 1-20, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; DE SOUZA, A.A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with especial reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 435-443, 1994.

LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Lês forms évolutives de la leishmanioses viscérale canine. Elaboration d`unetypologie bio-clinique à finalité épidémiologique. **Annales Parasitologie**, v. 54, p. 277-295, 1979.

LEITE, V.H.; CROFT, S.L. Hepatic extracellular matrix in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **International Journal Experimental Pathology**, v. 77, p. 181-190, 1996.

LIEW, F.Y.; COX, F.E. Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. **Immunology Today**, v. 12, p. A17-A21, 1991.

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.

LIVNI, N.; ABRAMOWITZ, A.; OKON, E.; MORAG, A . Immunoperoxidase method of identification of leishmaniasis in routinely prepared histological sections. **Virchows Archivs Pathological Anatomy Histopathology**, v. 401, p. 147, 1983.

LOCKESLEY, R.M. HEINZEL, F.P. SADICK, M.D. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T cell subsets. **Annales Institute Pasteur Immunologie**, v. 138, p. 744-749, 1987.

LOCKESLEY, R.M.; LOUIS, J.A. Immunology of leishmaniasis. **Current Opinion Immunology**, v. 4, p. 413-418, 1992.

LONGSTAFFE, J. A.; GUY, M.W. Leishmaniasis in dogs. **Veterinary Annual**, v. 25, p. 358-367, 1995.

LUQUE, E.H.; MONTES, G.S. Progesterone promotes a massive infiltration of the rat uterine cervix by eosinophilic polymorphonuclear leukocytes. **Anatomical Record**, v. 223, p. 257-265, 1989.

MANCIANTE, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. & PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonisl treatment. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 566-567, 1988.

MARCHAL, I.S.A.; MARCHAL, T.; MOORE, P.; MAGNOL, J.P.; BOURDOISEAU. Infection of canine Langerhans cell and interdigitating dendritic cell by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. **Revue Médecine Veterinaire**, v. 148, n. 1, p. 29-36, 1997.

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

MARTINS, A.M.C.R.P.F.; TAMASO, E.; GUERRA, J.L. Estudo histoquímico de proteínas fibrilares da matriz extracelular em neoplasias mamárias benignas e malignas na espécie canina. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 43-49, 2002.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L.M.; GRIMALD, Jr.; MOMEM, 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, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 349-357, 1985.

McGWIRE, B.S.; CHANG, K.P.; ENGMAN, D.M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 1008-1010, 2003.

MENDES, W.D.A. S.; SILVA, A.A.; TROVAO, J.D.E. R.; SILVA, A.R.; COSTA, J.M. Space expansion of the American visceral leishmaniasis in São Luis, Maranhão, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 227-231, 2002.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J. & ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leshmania infantum* to colonized *Phebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491-493, 1984.

MOLL, H. Epidermal langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunology Today**, v. 14, n. 8, p.383-387, 1993.

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

MONTES, G.S.; COTTA-PEREIRA, G.; JUNQUEIRA, L.C.U. The connective tissue matrix of the peripheral nervous system. **In: FEDOROFF, S. (Ed). Advances in cellular neurobiology**, v. 5, p. 177-218, 1984.

MONTES, G.S.; KRISZTÁN, R.M.; SHIGIHARA, K.M.; TOKORO, R.; MOURÃO, P.A.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. **Histochemistry**, v. 65, p. 131-141, 1980.

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

MOSMAN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone I: definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v.136, p.2348-2357, 1986

MOSSER, D.M.; SPRINGER, T.A.; DIAMOND, M.S. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD 11b/CD18). **Journal of Cell Biology**, v. 116, p. 511-520, 1992.

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.

MULLER, I.; KROPT, P.; ETGES, R.J.; LOUIS, J.A. Gamma interferon response in secondary *Leishmania* infection: role CD8⁺ T cells. **Infections and Immunology**, v. 61, p. 3730-3738, 1993.

OLIVEIRA, G.G.S.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p. 243-248, 1993.

ONZENSOY, S.; OZBEL, Y.; TURGAY, N.; ALKAN, M.Z.; GUL, K.; GILMAN-SANCHS, A.; CHANG, K.P.; REED, S.G.; OZCEL, M.A. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 181-188, 1993.

PANARO, M.A.; PUCCINI, V.; FAILERO, S.M.; MARZIO, S.M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan (lpg) inhibits respiratory burst and chemotaxis of dog phagocytes. **Microbiologica**, v. 19, p. 107-112. 1996.

PEARSON RD. Pathology of leishmaniasis. In Warren KSS (ed), **Immunology and molecular biology of parasitic infection**, Blackwell Scientific Publication, Boston, p.71-86, 1993.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p.1-13, 1996.

PINELLI, E.; KILLINK-KENDRICK.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITEMBERG, J. Cellular e and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infections and Immunity**, n. 62, p. 229-235, 1994.

PROCTOR, R.A. Fibronectin: a brief overview of its structure, function, and physiology. **Review of Infections and Diseases**, suppl 4: S317-S319, 1987a.

PROCTOR, R.A. Fibronectin: an enhancer of phagocyte function. **Review of Infection and. Diseases**. Suppl. 4: S412-S419, 1987b.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIM, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 264 p. 1992.

PUNTES, S.M.; SACKS, D.L.; DA SILVA, R.P.; JONNER, K.A. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **Journal Experimental Medicine**, v. 167, p. 887-902, 1988.

REY, L. Bases da parasitologia médica. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. xii+379 p, 2002.

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

RIBEIRO, I.J. Análises estatísticas no SAEG. Viçosa. Editora UFV, 2001. 301p.

RIDLEY, D.S. Pathology. In leishmaniasis in Biology and Medicine In The leishmaniasis, Peters W, Killich-Kendrick (Eds) Academic Press, London, p. 670-680, 1987.

RIOUX, J.A; KILICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A.J.; YONG, C.J. LANOTTE, G. & BAILLY, M. Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. XI La Leishmaniose viscérale canine: Succès de la transmission expérimentale "Chien-Phlébotome-Chien" par la piqûre de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. **Annales de Parasitologie**, v. 54, p. 401-407, 1979.

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.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J.F.; ANJUERE, F.; FRAGAKI, K.L.E.; FICHOUX, Y.; KUBAR, J. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiology**, v. 1, p. 17-23, 2001.

SACKS, D.L; LOUIS, J.A; WIRTH, D.F. Leishmaniasis. In WARREN, K.S.(ed). **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. 3ed. Blackwell Scientific Publications, Boston, p. 237-268, 1993.

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C.E. APUD CARDOSO, L.; CABRAL, M. Leishmania and canine Leishmaniasis. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, XCIII (527), p. 122-141, 1998.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. **Veterinary Quarterly**, v. 10, p. 101-107, 1988.

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.

TACCHINI-COTTIER, F.; ZWEIFEL, C.; BELKAID, Y.; MUKANKUNDIYE, C.; VASEI, M.; LAUNOIS, P.; MILON, G.; LOIUS, J.A. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 2628-2636, 2000.

TAFURI, Wg.L.; de OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathologic picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 203, 2001.

TANNER, C.E. Innunobiology of visceral leishmanisis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 78, p. 105-111, 1996.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmania: is it time to change strategies? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 2, p. 287-292, 1995.

TITUS, R.G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; VASSALI, P.; CEROTTINI, J.C.; LOUIS, J.A. Involvement of specific LyT-2 + T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. **European Journal Immunology**, v. 17, p. 1429-1433, 1987.

VAN DER REST, M.; GARRONE, R. Collagen family of proteins. **FASEB Journal**, v. 5, p. 2814-2823, 1991.

VIDOR, B.L.; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DUBREUIL, N.; BISSUEL, G; MOREAU, Y.; RIOUX, J.A. Le cancre d'inoculation dans la leishmaniose canine a leishmania infantum. Etude d'une cohorte en région cévenole. **Pratique Médecine Chirurgie Animal Comparative**, v. 26, p. 133-137, 1991.

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.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, 793, WHO, Geneva, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization Technical Series**, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the second WHO Meeting on Emerging Infections Diseases. Document WHO/CDS/BVI/95.2. Geneva, Switzerland: WHO, January, 1995.

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***, v. 14, p. 527–530, 2002.