



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-graduação em Saúde Animal

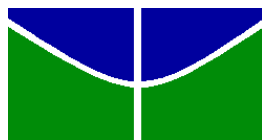
**DESCRIÇÃO MORFOQUANTITATIVA DE LESÕES CUTÂNEAS EM CÃES
COM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

LUCIANA RIBEIRO CAMARGOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-graduação em Saúde Animal

**DESCRIÇÃO MORFOQUANTITATIVA DE LESÕES CUTÂNEAS EM CÃES
COM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

LUCIANA RIBEIRO CAMARGOS

ORIENTADOR: EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2015

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CAMARGOS, L. R. Descrição morfoquantitativa de lesões cutâneas em cães com Leishmaniose Visceral Canina. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 16 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizado reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo e comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrita do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Camargos, Luciana Ribeiro

Descrição morfoquantitativa de lesões cutâneas em cães com Leishmaniose Visceral Canina./ Luciana Ribeiro Camargos
Orientação de Eduardo Maurício Mendes de Lima.
Brasília, 2015. 16 p.: il.

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. Análise Quantitativa
2. Leishmaniose
3. Pele
4. Cão I. Lima, E.M.M. II. Doutor

Agris/FAO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**DESCRIÇÃO MORFOQUANTITATIVA DE LESÕES CUTÂNEAS EM CÃES
COM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

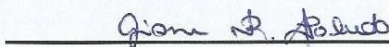
LUCIANA RIBEIRO CAMARGOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE ANIMAL.

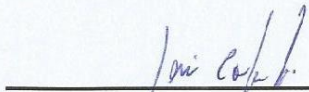
APROVADA POR:



EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA DOUTOR (UNB)



GIANE REGINA PALUDO (UNB)



JAIR DUARTE DA COSTA JUNIOR (UNB)

BRASÍLIA/DF, 26 DE FEVEREIRO DE 2015

Dedico esse trabalho aos meus animais de estimação, além de terem sido a minha fonte de inspiração na escolha da minha profissão, são minha fonte diária de alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a filosofia do Budismo de Nitiren Daishonin e a todas as pessoas que a ela se dedicam, pois é por meio dos seus ensinamentos de fé, prática e estudo que encontro sempre força e boa sorte para conseguir ultrapassar todos os obstáculos necessários para o meu aprendizado e felicidade.

A minha mãe por ter me transmitido princípios básicos e necessários para a minha formação, como a importância do esforço, estudo e dedicação. Ao meu irmão pela eterna torcida pelo meu sucesso. Ao meu noivo Rômulo, por estar sempre disponível em me ajudar com o que for preciso. Sua contribuição a este trabalho com certeza foi essencial! Você é o melhor presente que a vida poderia ter me dado.

A minhas amigas da vida toda, Michelle, Lis, Li e Claudinha, vocês são a família que eu pude escolher. Um agradecimento especial a Flávia, uma parceira para todas as horas, que se manteve sempre presente e prestativa durante esses dois anos. Aos novos amigos que fiz graças a esse experimento, Léo e Pat, obrigada por tudo!!! Ao querido Gu, pela companhia e risadas durante as disciplinas do mestrado.

Ao pessoal da Diretoria de Vigilância Ambiental (Dival), em especial a Cleide Damasceno, por terem me recebido e cedido os animais utilizados no presente estudo.

Ao meu orientador por se mostrar disponível a me orientar desde a nossa primeira conversa, por ter contribuído para o meu crescimento profissional e acadêmico e por ter me ajudado a concretizar mais uma grande etapa da minha vida. E que venham as próximas. Muito obrigada a todos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIações.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	2
RESULTADOS.....	3
DISCUSSÃO	4
CONCLUSÕES.....	7
REFERÊNCIAS.....	8

LISTA DE ABREVIATURAS

MEC	matriz extracelular
RIFI	Reação de imunofluorescência
ELISA	Ensaio imunoenzimático
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
Dival	Diretoria de Vigilância Ambiental
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 A. Dermatite ulcerativa (35,48%); B. Dermatite nodular (16,13%); C. Hipotricose (41,93%); D. Alopecia (19,35%); E. Dermatite esfoliativa seca (29,03%); F. Dermatite crostosa (41,93%); G. Dermatite eritematosa (12,90%); H. Despigmentação (3,22%); I. Hiperpigmentação (3,22%); J. Hiperqueratose (3,22%)	11
Figura 2 Tipo celular inflamatório encontrado (A) e graduação da intensidade inflamatória (B)	12
Figura 3 Localização celular inflamatória (A) e intensidade de amastigotas visualizadas (B)	12
Figura 4 Lesões não inflamatórias histopatológicas identificadas nas 31 lesões avaliadas.	13
Figura 5 Imagens histológicas das lesões mais comumente encontradas: colagenólise (seta amarela em A) e colágeno íntegro (seta preta em A), crosta (B), hiperqueratose ortoqueratótica (C), úlcera (D) e incontinência pigmentar melânico dérmica (E). Visualização de formas amastigotas no interior de histiócitos (F)	14
Figura 6 Graduação da intensidade de colagenólise	15
Figura 7 Imagens de fragmentos corados com Picrosirius Red (100X) sob luz não polarizada (A e C) e polarizada com predomínio de colágeno do tipo I representado por fibras vermelhas (seta branca, em B) e do tipo III representado por fibras esverdeadas (seta amarela, em D).	15

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina é uma doença que acomete, dentre outros órgãos, a pele. Esse estudo teve como objetivo quantificar as alterações morfológicas e histológicas presentes nas várias apresentações cutâneas de cães naturalmente infectados. Para isso foram avaliados 31 fragmentos de pele de 20 animais com dermatite esfoliativa seca, alopecia, hipotricose, crosta, nódulo, úlcera, eritema, despigmentação, hiperpigmentação e/ou hiperqueratose. Foram determinados o padrão microscópico inflamatório e não inflamatório de cada lesão, e realizada a mensuração da intensidade inflamatória, parasitológica e de colagenólise, e a histomorfometria por meio da detecção e diferenciação dos colágenos do tipo I e III. As regiões acometidas foram cabeça (40,35%), membros (21,05%), tórax (15,8%), difusa (8,77%), abdômen (5,26%), pelve (5,26%) e cervical (3,51%), sendo a dermatite crostosa e a hipotricose as macroleões mais encontradas. Houve o predomínio de infiltrado histiocítico e a maioria dos fragmentos apresentaram intensidade inflamatória acentuada, sendo a inflamação visualizada principalmente em região peri/intra-anexo. A forma amastigota foi visualizada em 48,38% dos casos. Colagenólise, crostas e hiperqueratose ortoqueratótica foram as lesões não inflamatórias mais encontradas. Houve predominância do colágeno maduro ($60,31\% \pm 2,906$) em relação ao imaturo ($8,720\% \pm 1,187$) em região de derme e esses dados foram estatisticamente significativos. Houve um discreto aumento de colágeno do tipo III e diminuição do colágeno do tipo I, ao se comparar amostras com e sem presença de amastigotas. Concluiu-se que a presença do infiltrado inflamatório em cães com LVC no DF, contribuiu para as mudanças ocorridas na matriz extracelular .

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leishmaniose, pele, cão, colágeno, amastigota.

ABSTRACT

The Canine Visceral Leishmaniasis is a disease that affects, among other organs, the skin. This study aimed to quantify the morphological and histological changes present in various skin samples from naturally infected dogs. To achieve the proposed objective were evaluated 31 skin flakes of 20 animals with dry exfoliative dermatitis, alopecia, hypotrichosis, crust, nodules, ulcers, erythema, depigmentation, hyperpigmentation and/or hyperkeratosis. Inflammatory and non-inflammatory microscopic pattern of each lesion, the measurement of inflammatory intensity, parasitological and collagenolysis, and histomorphometry through the detection and differentiation of type I and III collagens were performed. The regions affected were head (40.35%), members (21.05%), chest (15.8%), diffuse (8.77%), abdomen (5.26%), pelvis (5.26%) and cervical (3.51%), the crusted dermatitis and hypotrichosis large lesions were the most frequent injuries. There was a predominance of histiocytic infiltrate and most of the fragments showed severe inflammatory intensity, with inflammation viewed mainly in peri/intra-annexed region. The amastigotes were seen in 48.38% of cases. Collagenolysis, crusts and orthokeratotic hyperkeratosis were the most frequent non-inflammatory lesions. There was a predominance of mature collagen ($60.31\% \pm 2.906$) compared to immature ($8,720 \pm 1,187\%$) in the dermis region and these data were statistically significant. There was a slight increase in collagen type III and decreased collagen type I, when comparing samples with and without the presence of amastigotes. It was concluded that the presence of inflammatory infiltrate in dogs with CVL in DF contributed to the changes in the extracellular matrix.

INDEX TERMS: Leishmaniasis, skin, dog, collagen, amastigote.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma antroponose cosmopolita, pansistêmica, potencialmente fatal, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* ou *Leishmania chagasi*, transmitida pelo vetor biológico do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus* (Desjeux et al. 2000, Baneth et al. 2008). Ambientes úmidos são os mais favoráveis para a sobrevivência do mosquito, que apresentam comportamento mais ativo durante o anoitecer (Lainson 1988, Desjeux et al. 2000, CFSPH 2009). Esta enfermidade acomete diferentes espécies, sendo frequentemente diagnosticada em caninos (CFSPH 2009).

O ciclo biológico inicia-se com o flebotomíneo ingerindo sangue do vertebrado infectado, contendo o parasita no interior dos macrófagos, em sua forma amastigota. Após a ingestão o parasita chega ao trato digestivo, onde sofrerá a transformação para forma promastigota, ocorrendo posterior multiplicação por cissiparidade, sendo inoculado pelo vetor no hospedeiro vertebrado, durante a sua alimentação. As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, se transformam em amastigotas, iniciando a sua multiplicação intracitoplasmática e posterior disseminação por todo o organismo (CFSPH 2009).

O mecanismo de ligação dos microorganismos patogênicos à superfície celular do hospedeiro é um fator essencial para o estabelecimento da infecção. A *Leishmania spp.* realiza essa adesão por meio de glicoproteínas presentes em sua superfície que, por sua vez, se ligam a glicoproteínas celulares do animal infectado (Mosser et al. 1987). A secreção de enzimas proteolíticas por meio dos parasitas promove a degradação tecidual e posterior penetração em seu sistema vascular permitindo-o migrar para diferentes estruturas favoráveis ao seu desenvolvimento. A interação entre a amastigota e as proteínas da matriz extracelular (MEC) é frequente, sendo o colágeno o principal componente proteico presente na ferida aguda e no processo de reparação tecidual (Esterre et al. 1991, Rhoads & Fetterer 1997, Robson et al. 2001).

Em alguns cães os sinais clínicos se desenvolvem logo após o período de infecção. Entretanto, há casos onde os animais infectados podem permanecer assintomáticos por toda a vida (CFSPH 2009). Cães acometidos podem apresentar sinais clínicos viscerais e tegumentares variados (Torres-Neto et al. 2008). A pele canina apresenta grande importância por ser o órgão onde ocorre a primeira interação entre o parasita e o sistema imune canino. A presença de amastigota na pele de canídeos, inclusive de animais assintomáticos, confirma a influência desta espécie na propagação da doença (Giunchetti et al. 2006, Queiroz et al. 2010, Queiroz et al. 2011).

Dentre as manifestações cutâneas descritas, destaca-se a dermatite esfoliativa seca com descamação excessiva, associada ou não a alopecia ou hipotricose (Ciaramella et al. 1997, Saridomichelakis 2007). Úlcera, alopecia periorbital ou difusa, dermatite nodular, onicogribose, onicose, pelos secos e opacos também são descritos (Ciaramella et al. 1997, Papadogiannakis et al, 2005). Lesões menos comuns, tais como hiperqueratose nasodigital, eritema multifome, despigmentação, pústulas e paniculite, são relatadas. Dermatites bacterianas secundárias são comuns. (CFSPH, 2009).

Na avaliação dermatohistopatológica destacam-se a hiperqueratose ortoqueratótica, hiperplasia epidérmica, excitose, crosta, incontinência pigmentar, edema superficial, dermatite nodular, perivascular e intersticial, perifoliculite, dermatite periglandular, adenite sebácea e foliculite (Papadogiannakis et al, 2005). O tipo celular inflamatório predominante são os mononucleares, com predominância de macrófagos e linfócitos. Neutrófilos, eosinófilos e mastócitos normalmente são encontrados em menor quantidade (Saridomichelakis et al. 2007). Algumas lesões microscópicas, dependendo da

sua intensidade, podem ser encontradas tanto em animais com a pele lesionada quanto em pele macroscopicamente hígida (Papadogiannakis et al, 2005).

O diagnóstico laboratorial da doença é realizado por meio do exame sorológico ou parasitológico. No entanto o diagnóstico correto pode ser considerado um problema de saúde pública devido à variedade de sinais clínicos e padrões histopatológicos inespecíficos semelhantes a outras enfermidades e à inexistência de um teste diagnóstico com 100% de sensibilidade e especificidade (Ministério da Saúde, 2006). Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste rápido TR DPP® são exames sorológicos comumente utilizados na triagem de diagnóstico e controle da doença tanto no setor público quanto no privado (Alvar et al. 2004, Santis et al. 2013). Já o diagnóstico parasitológico direto é realizado por meio da observação da forma amastigota encontrada em material biológico oriundo preferencialmente de punção/biópsia hepática, esplênica, de linfonodo, medula óssea e cutânea. Esse tipo de exame apresenta aproximadamente 100% de especificidade. A sensibilidade do exame parasitológico varia de acordo com o nível de parasitemia do animal (Alvar et al. 2004). O parasitológico indireto é comumente realizado por meio de técnicas de imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase, o PCR (Alvar et al. 2004).

A estereologia é uma ferramenta que fornece a determinação de parâmetros quantitativos tridimensionais de tecidos a partir de cortes bidimensionais, por meio do uso de teorias baseadas na geometria, matemática e estatística. A técnica permite, portanto, a obtenção de dados quantitativos sobre as estruturas internas de órgãos, tecidos e células, que podem ser utilizados em análises estatísticas e trabalhos relacionados à citologia e aos diferentes tipos de microscopia (Kamp et al. 2011). Sendo assim, esse estudo tem como objetivo estabelecer as alterações morfológicas e histológicas presentes na pele lesionada de cães com Leishmaniose Visceral Canina (LVC), quantificando e caracterizando como essas alterações se expressam nas várias apresentações cutâneas da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 20 animais provenientes da Diretoria de Vigilância Ambiental-DF (DIVAL), todos sorologicamente positivos para LVC e com lesão de pele. As amostras foram coletadas no período de maio a agosto de 2013. A positividade para LVC, condição essa que levava a realização da eutanásia desses animais, teve como base o diagnóstico obtido por meio ao teste rápido (TR DPP®) associados à ELISA e ao RIFI. O delineamento desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (protocolo 69800/2013).

Imediatamente após a realização da eutanásia dos animais, as lesões foram previamente descritas no dermatograma e, em seguida, fotodocumentadas (figura 1). Foram retirados fragmentos cutâneos de aproximadamente um centímetro de diâmetro oriundos de diferentes regiões corpóreas dos animais que apresentassem um ou mais dos seguintes padrões macroscópicos: dermatite esfoliativa seca, alopecia, hipotricose, crosta, nódulo, úlcera, eritema, despigmentação, hiperpigmentação, hiperqueratose. Não foram obtidas informações cronológicas das lesões amostradas e eventuais alterações clínicas decorrentes da doença não foram analisadas no presente experimento.

Para a preparação do material a ser analisado, os fragmentos de pele foram fixados em solução aquosa de formaldeído (10%) por 48 horas e histoprocessadas rotineiramente, coradas com Hematoxilina & Eosina sendo avaliado em microscopia de luz. A coloração de Picrosirius Red foi utilizada para evidenciação e diferenciação das fibras de colágeno mediante avaliação por microscopia de luz polarizada.

Após a confecção das lâminas realizou-se a avaliação histopatológica, por meio da elaboração do padrão microscópico inflamatório e não inflamatório de cada lesão. Também mensurou-se a intensidade inflamatória, parasitológica e de colagenólise presente em cada lesão como acentuada, moderada, discreta ou ausente. Para isso avaliou-se 10 campos/100x de cada lâmina, e padronizou-se que a alteração seria considerada discreta quando era encontrada em até 3 campos, moderada em até 7 campos e acima disso acentuada.

Para a realização da histomorfometria realizada na contagem do percentual de colágeno utilizou-se um microscópio óptico BX51 Olympus[®] acoplado ao programa de captura e análise de imagens ProgRes[®] Capture Pro 2.5, pelo qual foram obtidas fotomicrografias de cinco campos aleatórios de cada fragmento em aumento de 100X em óleo de imersão. Para a detecção e diferenciação dos tipos de colágenos I e III utilizou-se os fragmentos corados com Picrosirius Red associados à microscopia de polarização, sendo as imagens analisadas por meio do programa de análise de imagem Image-Pro Plus.6.0[®]. As fibras colágenas que fluoresceram em vermelho foram consideradas fibras do tipo I e aquelas em verde, do tipo III. Essa alteração na coloração se deve a diferença na birrefringência entre os dois tipos de colágeno.

Para o tratamento estatístico utilizou-se o programa GraphPad[®] Prism 6. As médias e os erros-padrão dos resultados obtidos das porcentagens dos colágenos de tipo I e III foram comparadas pela aplicação do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, com o intuito de analisar a distribuição da população. Para comparações pareadas foi aplicado o teste de Wilcoxon, com 5% de significância. Além disso, foi realizado o teste de Correlação de Spearman com o intuito de verificar qual seria a relação entre as duas variáveis na ocorrência nos animais avaliados.

RESULTADOS

A partir das análises realizadas, foi possível observar que os 20 animais disponíveis para a coleta das amostras de pele eram de diferentes raças e idades (não informadas), residiam em diversas localidades do DF, dentre elas as mais frequentes foram Sobradinho II, Sobradinho e Lago Sul, e 60% deles eram machos. Além disso, todos apresentaram resultados positivos para leishmaniose pelos teste TR DPP[®] e ELISA e 60% foram diagnosticados com LVC pelo teste RIFI.

Análise macroscópica

Foram encontrados diferentes padrões de lesão pré-estipulados, totalizando 31 lesões em 20 animais amostrados, sendo frequente a associação de diferentes lesões em um mesmo animal. As macrolesões e seus respectivos percentuais estão representados na figura 1.

As regiões frequentemente acometidas foram: cabeça (40,35%), membros (21,05%), tórax (15,8%), difusa (8,77%), abdômen (5,26%), pelve (5,26%) e cervical (3,51%), sendo a dermatite crostosa e a hipotricose os padrões mais recorrentes. Devido o maior índice de acometimento regional pertencer à região da cabeça, o seu resultado foi discriminado entre as principais sub-regiões acometidas: 39,13% em região periocular; 34,80% em pavilhão auricular e 26,10% em plano nasal. As regiões de maior incidência das lesões foram: dermatite crostosa em região periocular e torácica; a hipotricose em região periocular; a dermatite ulcerativa, nodular e alopecia em membros; a dermatite esfoliativa seca em pavilhão auricular; a dermatite eritematosa em região abdominal ventral. A hiperpigmentação foi encontrada apenas na região de pelve, a despigmentação e a hiperqueratose apenas em plano nasal.

Análise histopatológica

A celularidade e a intensidade do padrão inflamatório estão demonstradas nas figuras 2A e 2B, havendo predomínio do tipo histiocítico e da intensidade acentuada. A localização histológica predominante foi a peri/intra-anexo, correspondendo a 41,93%, estando esta e as demais localizações e suas respectivas intensidades descritas na figura 3A.

A forma amastigota foi visualizada em 48,38 % dos casos, estando sua intensidade discriminada na figura 3B. Dentre as lesões não inflamatórias mais comumente encontradas (figuras 4 e 5) destacam-se colagenólise, crostas e hiperqueratose ortoqueratótica. Pelo fato da colagenólise ser um achado predominante, a sua graduação foi estimada (figura 6).

Análise histomorfométrica

Os resultados da avaliação feita por meio da técnica de Picosirius Red sob luz polarizada para os colágenos do tipo I e III nas 31 lâminas revelaram uma predominância do colágeno maduro ($60,31\% \pm 2,906$) em relação ao imaturo ($8,720\% \pm 1,187$) na derme dos cães estudados. Imagens com predominância de colágeno maduro e imaturo podem ser vistos na figura 7. O Teste de Wilcoxon mostrou que houve diferença significativa entre essas variáveis analisadas ($P < 0,0001$). No Teste de Correlação de Spearman foi encontrada uma fraca e negativa correlação entre as mesmas variáveis ($-0,3653$).

Os valores percentuais de colágenos do tipo I e III foram associados com a intensidade de colagenólise encontrados em cada lâmina avaliada e estão demonstrados no quadro 1. Também realizou-se uma associação das médias das porcentagens de colágeno do tipo I e III com o fato de haver ou não presença de amastigota no tecido avaliado e os resultados podem ser observados no quadro 2.

DISCUSSÃO

Dentre os animais utilizados no presente estudo, 60% eram machos, no entanto não há predisposição sexual frente à infecção (Abranches et al. 1991, Sonoda et al. 2013). Provavelmente a infectividade dos animais esteja mais relacionada com o estilo de vida e o ambiente ao qual são submetidos. Cães errantes e/ou provenientes de região endêmica possuem maior prevalência desta enfermidade, em decorrência da ausência de medidas profiláticas, baixas condições socioeconômicas da população, alta carga parasitária regional e elevada exposição ao flebotomíneo (Dantas-Torres 2009; Marcondes & Rossi 2013).

Em se tratando das localidades de origem dos animais estudados, a grande maioria é proveniente de regiões com alta incidência da LVC revelados pelo boletim anual de 2013, fornecidos pela Secretaria de Estado e Saúde do DF. Segundo ele, essas localidades provavelmente possuam características ambientais domésticas que contribuem para o estabelecimento do flebotomíneo, como presença de matéria orgânica, desmatamento e processo migratório (Marcondes & Rossi 2013).

Análise macroscópica

A cabeça foi o principal local de ocorrência das lesões. Provavelmente a proximidade com as vias aéreas e a atração pelo gás carbônico expelido na respiração, torne este local preferível pelo mosquito-palha na busca de alimento (Sonoda et al. 2013).

A alta diversidade macroscópica cutânea evidenciada em cães positivos fez com que os padrões macroscópicos mais evidenciados no presente trabalho, hipotricose e a dermatite crostosa, corrobore com alguns autores (Sonoda et al. 2013) e discordem de outros resultados que indicaram a dermatite esfoliativa como a forma mais encontrada (Ferrer et al. 1988, Koutinas et al. 1992; Torres-Neto et al. 2008).

A hipotricose e a alopecia podem ocorrer pela ação direta do parasito sobre o folículo piloso, por alterações metabólicas do ácido pantotênico decorrente de lesões hepáticas ou por consequência da reação autoimune devido à deposição de imunocomplexos levando a destruição tecidual (Hommel 1978). Embora todos os animais sejam reativos para leishmaniose não foram feitos exames para descartar diagnósticos diferenciais que levem a esse mesmo sinal clínico, tais como raspados de pele ou microbiológico.

A dermatite ulcerativa em cães com LVC é comumente encontrada na literatura (Sonoda et al. 2013) e tal desordem cutânea estava localizada principalmente nos membros, corroborando com o encontrado na literatura (Ferrer et al. 1988). Tal lesão poderia estar relacionada à vasculite necrosante decorrente da lise de macrófagos parasitados (Ridley & Ridley 1983). Outra possibilidade baseia-se na severa caquexia decorrente da progressão da enfermidade culminando na dermatite ulcerativa por decúbito decorrente de isquemia tecidual em pontos de apoio (Torres-Neto et al. 2008; Pinhão 2009).

As áreas de dermatite esfoliativa seca eram recobertas de escamas brancas prateadas. Uma das causas dessa disfunção pode ser a destruição das glândulas sebáceas ou obliteração dos ductos por presença de processo inflamatório, o que resultaria na redução dos níveis lipídicos epidérmicos, levando a excessiva esfoliação cutânea (Papadogiannakis et al. 2005). No entanto, do presente estudo, em nenhum dos animais que apresentou esse tipo de macrolesão foi visto tal característica histopatológica correlacionada. Por apresentarem infiltrado linfo-histiocítico ou macrófágico, a disfunção na epidermopoiese pode estar relacionada à liberação de citocinas (Suter et al. 1997).

A dermatite nodular não é um tipo de lesão frequentemente encontrado em cães portadores da doença (Ferrer et al. 1988, Koutinas et al. 1992). A provável causa para isso é que essas manifestações clínicas são vistas principalmente em casos mais graves de imunossupressão (Slappendel & Ferrer 1998 Apud Gross et al. 2005). No presente estudo, esse tipo de lesão apresentou baixa incidência, correspondendo a 20% dos animais. Formas amastigotas foram visualizadas em todos os casos.

De maneira semelhante ao encontrado em outro estudo (Koutinas et al. 1992), as lesões de despigmentação e hiperqueratose nasal foram encontradas em apenas um animal do experimento (5%). Apesar de serem animais positivos para a doença, em ambas as lesões não foram visualizadas formas amastigotas, o que não pode se descartar que tais lesões se manifestem por outra razão que não seja a LVC.

Análise histopatológica

Assim como nesse estudo, infiltrados inflamatórios presentes em região perivascular, periglandular e perifolicular da derme também foram citados na literatura (Gross et al. 2005, Costa et al. 2008, Queiroz et al. 2011). A furunculose e o panículo adiposo também foram acometidos por lesão inflamatória (Solano-Gallego et al. 2004, Gross et al. 2005). O acometimento de camadas profundas cutâneas sugere pré-invasão vascular pelo parasito, necessário para atingir linfonodos periféricos e posterior disseminação por todo o organismo (Jacinto 2012).

Esse estudo mostrou, como já anteriormente relatado, que a presença de infiltrado inflamatório na pele de cães positivos para leishmaniose é um achado comum independente da presença ou não do parasito (Santos et al. 2004). Isso é decorrente da liberação de substâncias antigênicas provocada pela presença ou destruição do invasor, que induzem a ativação e recrutamento celular (Esterre et al. 1991).

O padrão inflamatório predominante nas lesões analisadas foi o mesmo descrito por vários autores (Ferrer et al. 1988, Koutinas 1992). O baixo número de mastócitos encontrados contradiz com os achados de Calabrese et al. 2010. Eles defendem a teoria de que esse tipo celular provavelmente participa da defesa do hospedeiro, modelando a resposta imune durante a invasão do patógeno. Menos da metade das lâminas apresentaram processo inflamatório neutrofílico, semelhante ao encontrado em outro estudo (Queiroz et al. 2011). Todas eram oriundas de lesões ulcerativas ou crostosas, onde a infecção bacteriana secundária se torna presente e os neutrófilos se fazem necessários, justificando a presença dos mesmos (Koutinas et al. 1992). Plasmócitos também foram descritos como achados eventuais (Esterre et al. 1991).

Amastigotas são vistas em menos de 50% das análises histológicas de animais positivos para LVC (Koutinas et al. 1992, Santos et al. 2004, Torres-Neto et al. 2008) o que esteve de acordo com o valor encontrado nesse experimento. Determinados fatores como a distribuição irregular das amastigotas em lesão cutânea, a capacidade da resposta imunológica do hospedeiro e o estágio da lesão podem levar a uma variação na carga, podendo influenciar a sua visualização histológica limitando a capacidade diagnóstica do exame, por isso esse é um método diagnóstico de baixa sensibilidade (Mengistu et al. 1992, Calabrese et al. 2010). No caso das lesões ulcerativas, a identificação de formas amastigotas também pode ser dificultada pelo fato dos parasitas serem destruídos rapidamente (Ferrer et al. 1988).

A presença da amastigota esteve sempre associada à presença de infiltrado inflamatório moderado a acentuado e o mesmo foi descrito por Santos et al. 2004. No entanto, há casos em que as lâminas continham inflamação acentuada e que o parasita não foi visualizado, corroborando com a ideia de que a presença da *Leishmania spp.* não necessariamente tem relação com a intensidade do processo inflamatório (Xavier et al. 2006).

Dentre as lesões não inflamatórias observadas, acantose, hiperqueratose ortoqueratótica ou paraqueratótica e crostas caracterizam a epiderme de animais positivos. A hiperqueratose pode estar vinculada a destruição das glândulas sebáceas por consequência do processo inflamatório gerado pela presença do parasita (Gross et al. 2005, Jacintho 2012). Lesões encontradas nesse estudo também relatadas na literatura são as úlceras (Jacintho 2012), a incontinência pigmentar melânica perifolicular e dérmica (Torres-Neto et al. 2008), a hiperplasia epidérmica (Esterre et al. 1991) e a fibroplasia (Barcelos 2009).

Análise histomorfométrica

Os colágenos dos tipos I e III são os predominantes na derme. A derme intacta contém, em média, 80% de colágeno do tipo I e 20% de colágeno do tipo III. Já em tecido dermal lesionado os valores do colágeno imaturo podem chegar a 40%, (Robson et al. 2001). Isso acontece porque a presença do infiltrado inflamatório resulta em uma remodelação significativa dos componentes da MEC, com a finalidade de reconstrução tecidual. O parasita e as células inflamatórias produzem enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação proteica da MEC, necessária para que haja a invasão no organismo do hospedeiro (Melo 2005).

Um estudo realizado com modelos murinos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*, identificou que na fase inicial da infecção há uma predominância de

colágeno do tipo I nas lesões dermatológicas primárias (Abreu-Silva et al. 2004). Outro trabalho mostrou que as formas promastigotas de *L. (L.) mexicana* são capazes de se prender a fibrilas de colágeno do tipo I, o que provavelmente explicaria o tropismo do parasita pela pele, local onde esse tipo de colágeno é o componente mais abundante da MEC. Isso explica a predominância desse tipo de colágeno para que a *leishmania* consiga infectar o hospedeiro e migrar para outros órgãos (Lira et al. 1997). Essa predominância diminuía gradativamente com o curso da doença sendo substituída pelo colágeno do tipo III, produzido pelos fibroblastos recrutados (Esterre et al. 1991), que se tornava predominante por volta de 90 dias pós-infecção. Nosso experimento identificou o predomínio de colágeno maduro (correspondendo a 80% ou mais do total de colágeno existente no fragmento) na grande maioria das lesões avaliadas (25/31), muitas delas que continham, inclusive, inflamação exacerbada, contrariando com resultados encontrados em outros estudos (Abreu-Silva et al. 2004, Melo 2005). Não se sabe o tempo de infecção dos animais avaliados, nem se as lesões avaliadas são primárias ou recidivantes, mas como a literatura descreve que em resposta ao estímulo inflamatório ocorre a síntese de colágeno do tipo III (Bailey et al. 1975), sugere-se que nestes animais em que houve predomínio do colágeno maduro a infecção seja recente. O fato dos fragmentos de pele terem sido retirados de diferentes regiões do corpo e os diferentes tipos celulares inflamatórios predominantes em cada lesão são fatores que possivelmente interferiram nos diferentes valores de colágenos encontrados.

O aumento de colágeno do tipo III em relação ao do tipo I está diretamente relacionado ao sucesso do parasitismo porque esse tipo de colágeno fornece suporte para as células inflamatórias parasitadas (Abreu-Silva et al. 2004). Isso explica os valores dos percentuais de colágeno do tipo III serem maiores no grupo de lesões em que foi identificado a presença de amastigotas (Quadro 2). A correlação fraca e negativa entre os dois diferentes tipos de colágeno mostra que o aumento de um deles afeta negativamente a predominância do outro, mesmo que em baixo grau, situação normalmente visualizada durante a substituição tecidual da MEC decorrente do processo inflamatório e parasitário.

Em relação ao grau de colagenólise, observou-se diminuição do colágeno maduro em mais de 10%, se compararmos a média dos valores encontrados nas lâminas com colagenólise nula e acentuada (Quadro 1). Isso esteve em acordo com o resultados de outros experimentos, nos quais foi observado que essa variação no percentual de colágenos do tipo I está diretamente relacionada ao grau de degradação tecidual provocado pela reação inflamatória presente devido à presença do parasita no tecido (Giunchetti et al. 2006).

CONCLUSÕES

A dermatite crostosa e a hipotricose foram as alterações cutâneas mais frequentes e a cabeça foi a região corpórea mais acometida, sendo a região periocular a principal sub-região acometida. A inflamação cutânea era composta predominantemente por infiltrado histiolinfocítico e a principal localização histológica inflamatória foi a peri/intra-anexo. A colagenólise foi achado constante e houve predominância do colágeno do tipo I em relação ao do tipo III na derme dos cães estudados. O aumento de colágeno do tipo III em relação ao do tipo I esteve diretamente relacionado ao sucesso do parasitismo e a maior degradação do colágeno dermal, concluindo que a presença do infiltrado inflamatório em cães com LVC no DF, contribuiu para as mudanças ocorridas na MEC.

REFERÊNCIAS

- Abranches P., Silva-Pereira M.C.D., Conceição-Silva F.M., Santos-Gomes G.M. & Janz J.G. 1991. Canine leishmaniosis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77:557–561.
- 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. 2004. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. *Parasitology* 128:385-390.
- Alvar J., Canavate C., Molina R., Moreno J. & Nieto J. 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57:1–88.
- Bailey A.J., Sims T.J., LeLouis M. & Bazin A. 1975. Collagen polymorphism in experimental granulation tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66:1160-1165.
- Baneth G., Koutinas A.F., Solano-Gallego L., Bourdeau P. & Ferrer L. 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24:324-330.
- Barcelos D.S. 2009. Aspectos clínicos e parasitários de cães infectados naturalmente por *Leishmania* spp em duas áreas de transmissão intensa com diferentes características ambientais e sociais. Dissertação de mestrado, Instituto de Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/ UFRRJ, Seropédica, RJ, 91p.
- Calabrese K.S., Cortada V.M., Dorval M.E., Souza Lima M.A.A., Oshiro, E.T., Souza, C.S.F., Silva-Almeida, M., Carvalho, L.O.P., Gonçalves da Costa, S.C. & Abreu-Silva S.C. 2010. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. *Exp. Parasitol.* 124:253-257.
- CFSPH (The Center for Food Security and Public Health), 2009. Leishmaniasis (cutaneous and visceral). College of Veterinary Medicine, Iowa State University Ames, Iowa. 11p.
- Ciaramella P., Oliva G., Luna R.D., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A. & Persechino A. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.* 141:539-543.
- Costa M.M., Lima W.G., Figueiredo M.M., Michalick M.S.M. & Tafuri W.L. 2008. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Vet. Pathol.* 45:613-616.
- Dantas-Torres F. 2009. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors* 2(Suppl 1):S1.
- Desjeux P., Meert J.P., Piot B., Alvar J., Medrano F.J., Portus M., Munoz C., Laguna F., Lopez Velez R., Salas A., Sirera G., Cisterna R., Montalban C., Quero H., Gradoni L., Gramiccia M., Russo R., Dedet J.P., Pratlong F., Dereure J., Deniau M., Izri A., Matheron S., Farault F., Marty P., Rosenthal E., Antunes F., Abranches P. & Pradinaud R. 2000. *Leishmania/HIV* co-infection in south-western Europe, 1990-1998, retrospective analysis of 965 cases, World Health Organization, WHO/Leish/2000.42.
- Esterre P., Dedet J.P., Guerret S., Chevallier M., Frenay C. & Grimaud J.A. 1991. Matrix remodelling and fibroblast phenotype in early lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Pathol. Res. Pract.* 187:924-930.
- Ferrer L., Rabanal, Jr., Fondevila, D., Ramos, J.A., Domingo M. 1988. Skin lesions in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice* 29: 381-388.
- Giunchetti R.C., Mayrink W., Genaro O., Carneiro C.M., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho, O.A., Marques M.J., Tafuri W.L. & Reis A.B. 2006. Relationship between canine

- visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Pathol.* 135:100–107.
- Gross T.L., Ihrke P.J., Walder E.J. & Affolter, V.R. 2005. *Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis*. 2ª Ed. Oxford, Blackwell. 895p.
- Hommel M. 1978. The genus of *Leishmania*: biology of the parasites and clinical aspects. *Bulletin de l' Institut Pasteur* 75:5-102.
- http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/DIVAL/Informativo_Ambiental__2013_Leishmanioses_EM_PDF.pdf
- Jacinto A.P.P. 2012. Análise da expressão de MMP-2 e MMP-9 na pele de cães com leishmaniose visceral. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária/ UNESP, Jaboticabal, 67p.
- Kamp S., Balkert L.S., Stenderup K., Rosada C., Pakkenberg B., Kemp K., Jemec G.B. & Dam T.N. 2011. Stereological estimation of epidermal volumes and dermo-epidermal surface area in normal skin. *Dermatology* 223: 131–139.
- Koutinas A.F., Scott D.W., Kontos V. & Lekkas S. 1992. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Vet. Dermatol.* 3:121–130.
- Lainson P. 1988. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 321:389–403.
- Lira R., Rosales-Encina J.L. & Arguello C. 1997. *Leishmania mexicana*: binding of promastigotes to type I collagen. *Exp. Parasitol.* 85:149-157.
- Marcondes M., Rossi C.N. 2013. Leishmaniose visceral no Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 50(5):341-352.
- Melo, F.A. 2005. Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 75p.
- Mengistu G., Akuffo H., Fehninger T.E., Negese Y. & Nilsen R. 1992. Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 86:154-157.
- Ministério da Saúde, 2006. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. 1ªEd. Brasília. 122p.
- Mosser D.M., Vlassara H., Edelson P.J. & Cerami A. 1987. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J. Exp. Med.* 165:140-145.
- Papadogiannakis E.I., Koutinas A.F. & Saridomichelakis M.N. 2005. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104: 227–237.
- Pinhão C.P.R. 2009. Leishmaniose canina – estudo de 158 casos da região de Lisboa. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 45p.
- Queiroz N.M.G.P., Assis J., Oliveira T.M.F.S., Machado R.Z., Nunes C.M. & Starke-Buzetti W.A. 2010. Immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISA-test for canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19:34–40.
- Queiroz N.M.G.P., Silveira R.C.V., Noronha Jr. A.C.F., Oliveira T.M.F.S., Machado R.Z. & Starke-Buzetti W.A. 2011. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Veterinary Parasitology* 178:1-8.
- Rhoads M.L. & Fetterer R.H. 1997. Extracellular matrix: a tool for defining the extracorporeal functions of parasite proteases. *Parasitol. Today* 13:119–122.
- Ridley, D. S. & Ridley, M. 1983. The evolution of the lesion in cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Pathology* (141): 83-96.

- Robson M.C., Steed D.L. & Franz M.G. 2001. Wound Healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr. Probl. Surg.* 38(2):71–141.
- Santis B. de., Santos E. G. B., Souza C. da S. F. de. & Chaves S. A. de M. 2013. Performance of DPP™ immunochromatographic rapid test (IRT) for canine visceral leishmaniasis: comparison with other serological methods in suspected dogs from Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 50 (3): 198-205.
- Santos W.L.C. dos, Badaró J.D.R. & de-Freitas L.A.R. 2004. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. *Parasitol. Res.* 92:89-94.
- Saridomichelakis M.N., Koutinas A.F., Olivry T., Dunston S.M., Farmaki R., Koutinas, C.K. & Petanides T. 2007. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. *J. Compil.* 18:227–233.
- Slappendel R.J. & Ferrer L. 1998. Leishmaniasis, p.450–458. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2ª Ed. Saunders, Philadelphia.
- Solano-Gallego L., Fernandez-Bellon H., Morell P., Fondevila D., Alberola J., Ramis A. & Ferrer L. 2004. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol.* 130:7-12.
- Sonoda M. C., Rossi C. N., Laurenti M.D. & Larsson, C.E. 2013. Estudo retrospectivo de casos caninos de leishmaniose atendidos na cidade de São Paulo, Brasil (1997-2007). *Ciências Agrárias, Londrina* 34(2): 741-758.
- Suter M.M., Cramer, F.M., Olivry T., Mueller E., Von Tscherner C. & Jensen, P.J. 1997. Keratinocyte biology and pathology. *Veterinary Dermatology* 8(1):67-100.
- Torres-Neto R., Rodrigues M.M.P., Amorim R.L., Conceição L.G., Luvizotto M.C.R. & Franco S.R.V. 2008. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. *Ciências Agrárias* 29(3):667-676.
- Xavier S.C., Andrade H.M., Hadade Monte S.J., Chiarelli I.M., Lima W.G., Michialick M.S., Tafuri W.L. & Tafuri W.L. 2006. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Veterinary Research* 2:17.



Figura 1. Macrolesões e as respectivas percentagens encontradas: A. Dermatite ulcerativa (35,48%); B. Dermatite nodular (16,13%); C. Hipotricose (41,93%); D. Alopecia (19,35%); E. Dermatite esfoliativa seca (29,03%); F. Dermatite crostosa (41,93%); G. Dermatite eritematosa (12,90%); H. Despigmentação (3,22%); I. Hiperpigmentação (3,22%); J. Hiperqueratose (3,22%).

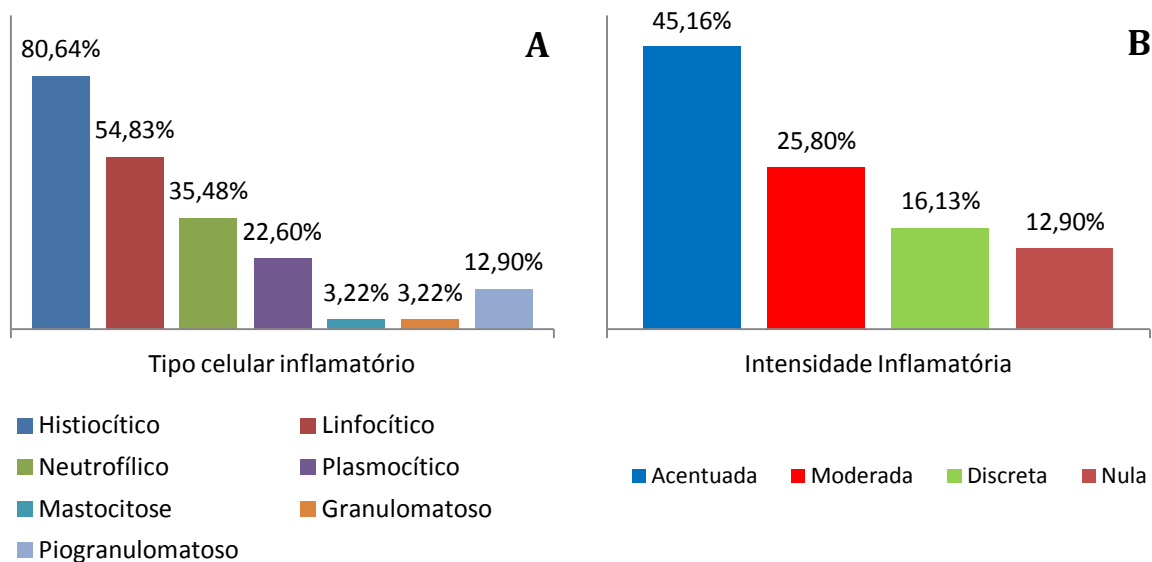


Figura 2. Tipo celular inflamatório (A) e graduação da intensidade inflamatória (B) encontrados.

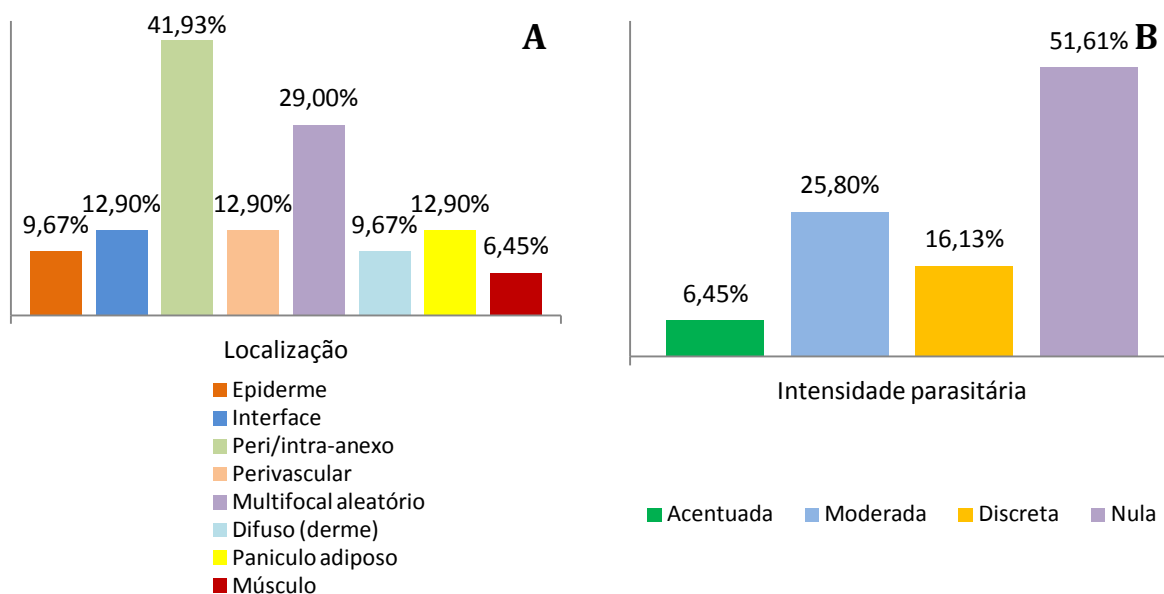


Figura 3. Localização onde foram encontradas as células inflamatórias (A) e intensidade de amastigotas visualizadas (B).

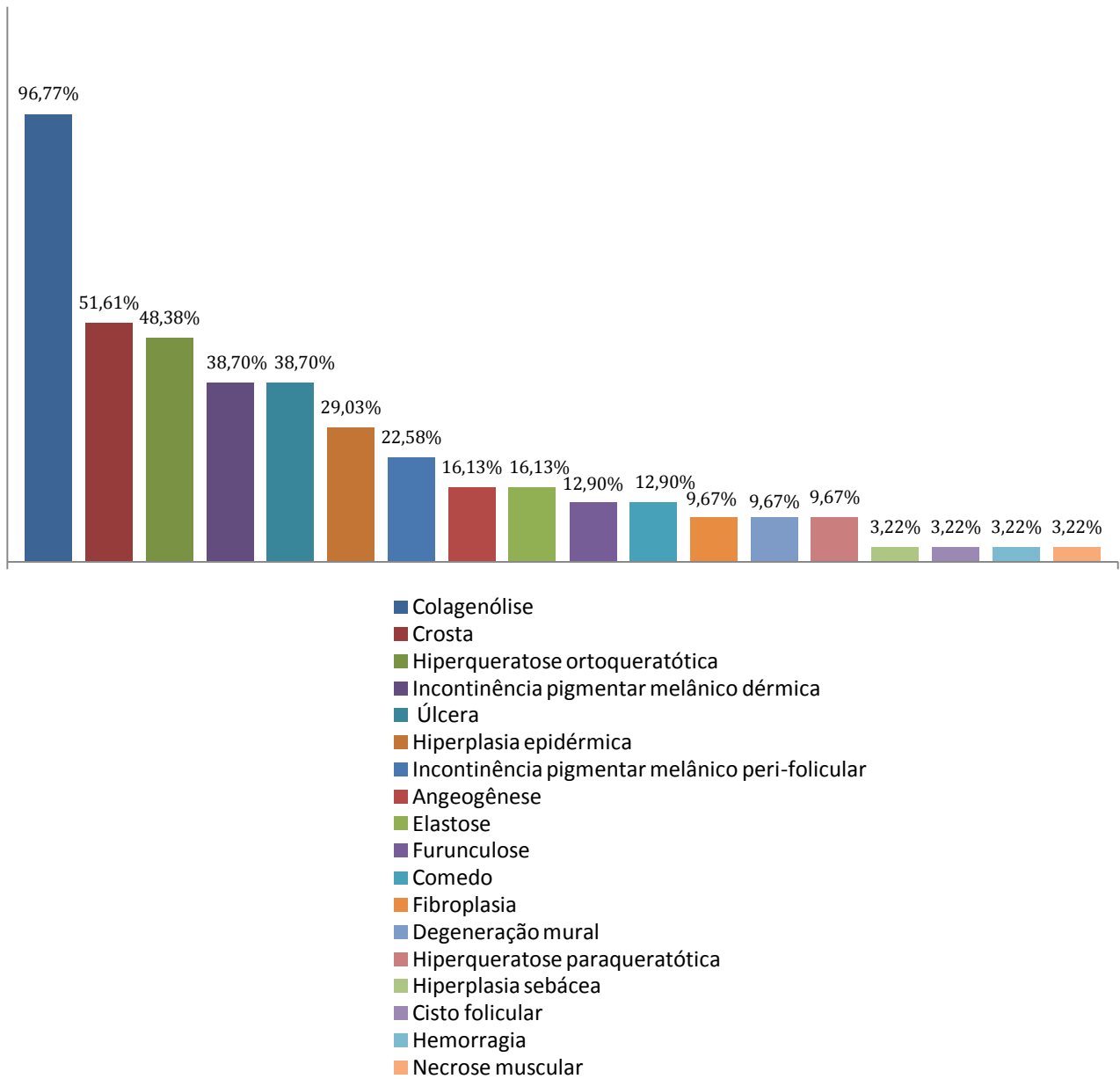


Figura 4. Lesões não inflamatórias histopatológicas identificadas nas 31 lesões avaliadas.

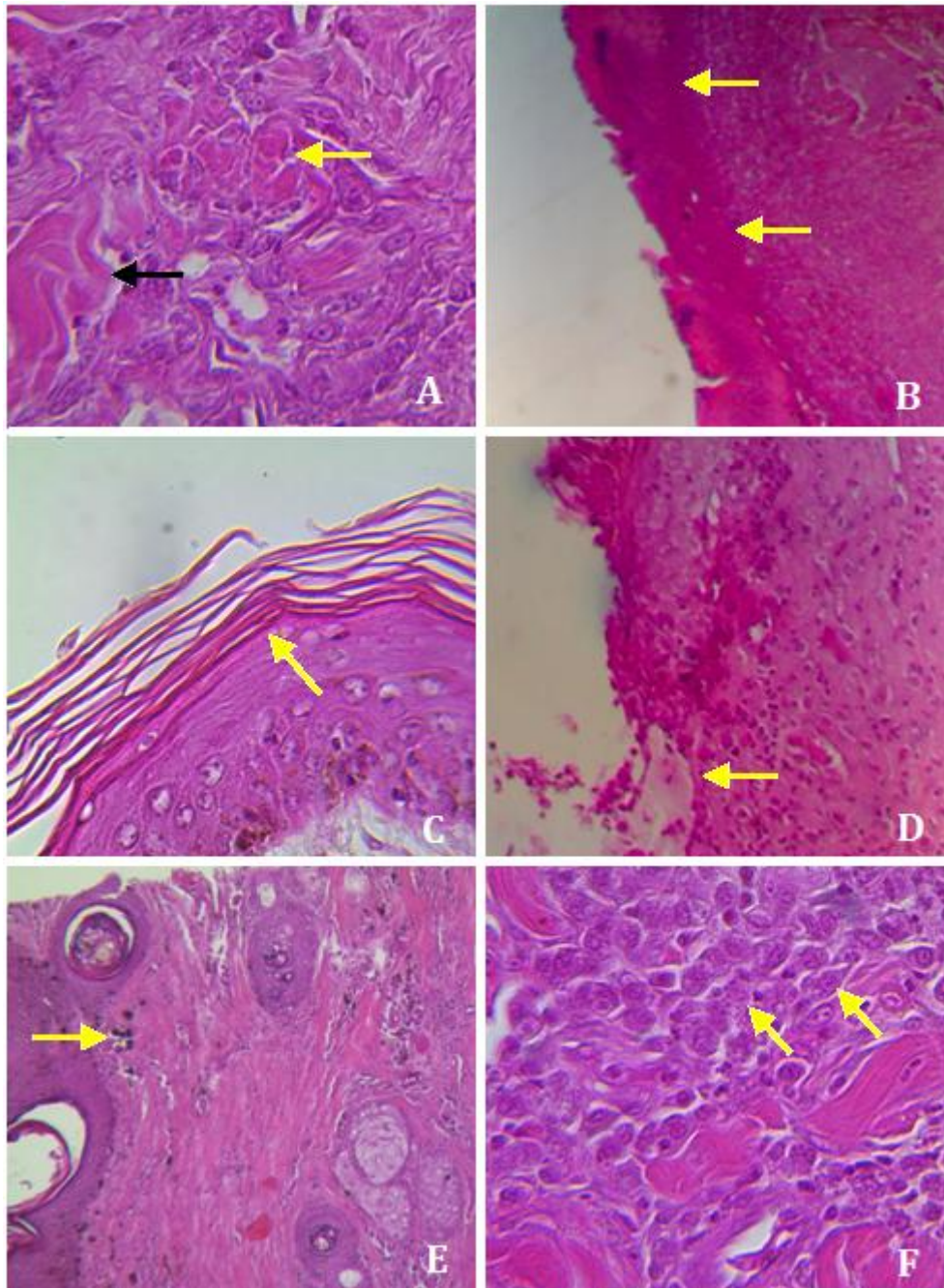


Figura 5. Imagens histológicas das lesões mais frequentes: colagenólise (seta amarela em A) e colágeno íntegro (seta preta em A), crosta (B), hiperqueratose ortoqueratótica (C), úlcera (D) e incontinência pigmentar melânico dérmica (E). Visualização de formas amastigotas no interior de histiócitos (F).

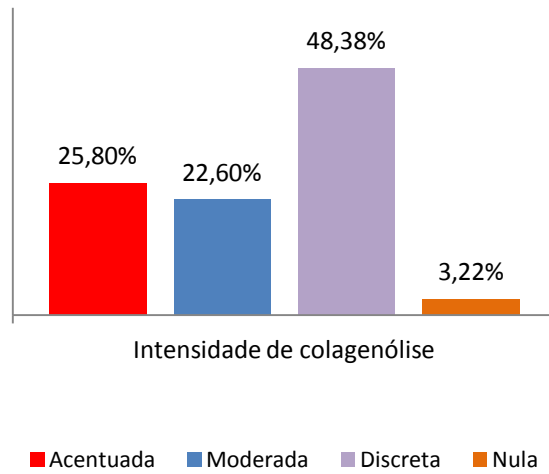


Figura 6. Graduação da intensidade de colagenólise encontrada.

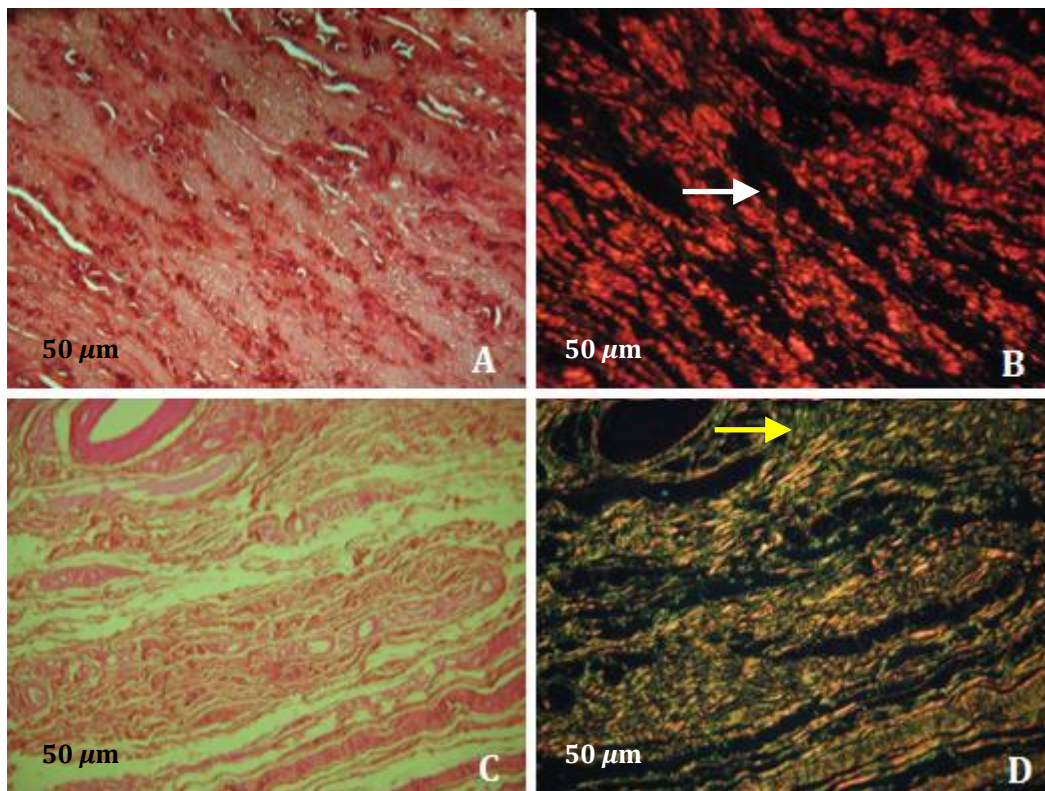


Figura 7. Imagens de fragmentos corados com Picrosirius Red (100X) sob luz não polarizada (A e C) e polarizada com predomínio de colágeno do tipo I representado por fibras vermelhas (seta branca, em B) e do tipo III representado por fibras esverdeadas (seta amarela, em D).

Quadro 1. Proporção entre intensidade de colagenólise com a quantidade de colágenos do tipo I e III

	Intensidade de colagenólise			
	Acentuada	Moderada	Discreta	Nula
Colágeno do tipo I	52,89%	56,14%	61,95%	63,47%
Colágeno do tipo III	12,70%	10,31%	11,27%	10,37%

Quadro 2. Proporção entre a presença ou ausência de amastigota e a quantidade de colágenos do tipo I e III.

	Com amastigota	Sem amastigota
Colágeno do tipo I	57,35%	Colágeno do tipo I 63,89%
Colágeno do tipo III	14,41%	Colágeno do tipo III 11,05%