

APOPTOSE E ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA PELE DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS PELA *LEISHMANIA (LEISHMANIA) CHAGASI*

VERÇOSA, B.L.A.^{1*}; TAFURI, W.L.¹; MENDONÇA, I.L.²; COSTA, F.A.L.²; VITORINO FILHO, R.N.L.²; MEÇA, K.K.O.L.¹; PEREIRA, N.B.¹; VASCONCELOS, A.C.¹.

RESUMO

Leishmaniose visceral é uma zoonose causada por *Leishmania* e transmitida por picada do *Lutzomyia longipalpis*. Neste estudo foram utilizados 75 animais positivos com o objetivo de caracterizar e mensurar a resposta inflamatória e detectar apoptose. Parâmetros morfométricos foram correlacionados com a sintomatologia clínica. O estudo histomorfométrico foi feito manualmente em imagens obtidas de 25 campos histológicos aleatórios em microscópio de luz com objetiva planapocromática de 10x. Histologicamente observou-se nos animais sintomáticos, infiltrado inflamatório multifocal variando de média a severa intensidade. Na análise morfométrica, nos animais sintomáticos, verificou-se um total de 984 focos inflamatórios com uma área média de 2.111,56 μ^2 , perímetro de 255,85 μ e de diâmetros maior e menor 62,60 e 33,93 μ , respectivamente. Nos animais assintomáticos, o infiltrado inflamatório quando presente era difuso, variando de mínima a média intensidade. Na análise morfométrica, obteve-se um total de 19.932 focos perfazendo uma área de 8768170,82 μ^2 . Nos animais assintomáticos, obteve-se um total de 6120 focos inflamatórios com área média de 369,28 μ^2 , perímetro de 103,89 μ e de diâmetros maior e menor 27,28 e 26,89 μ . Pelo TUNEL foi observado marcação em apenas 3 animais sendo 2 assintomáticos e 1 sintomático. Nossos resultados sugerem que os animais sintomáticos possuem uma resposta inflamatória mais intensa quando comparada aos animais assintomáticos. Apoptose pode estar mais ligada à resistência que a susceptibilidade a Leishmaniose visceral.

Palavras Chave: pele, cão, Leishmaniose visceral, apoptose.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é causada, no Brasil, pela espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*, transmitida pelo flebotômio *Lutzomyia longipalpis* acometendo roedores e mamíferos.

A pele desempenha um papel epidemiológico importante como porta de infecção, determinando o tipo de resposta imune gerada pelo hospedeiro. As lesões

¹Departamento de Patologia Geral. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais; e-mail: brbaravet@yahoo.com.br, anilton@icb.ufmg.br

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Piauí.

cutâneas na LV são muito comuns e consistem em alopecia generalizada com ou sem a presença de dermatites ulcerativas, nodulares ou pustulosas (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2004). Estas lesões ocorrem especialmente onde os vetores se alimentam como ao redor do focinho, orelhas e olhos (CARLTON e McGAVIN, 1998). A orelha merece destaque devido a sua elevada carga parasitária quando comparada a outras regiões da pele (VERÇOSA *et al.*, 2005).

A morte celular programada participa da evolução das lesões provocada por parasitos, inclusive protozoonoses, devido à proteção exercida por certos agentes infecciosos contra apoptose de células hospedeiras como observado em estudos com *Cândida albicans*, *Leishmania ssp* e *Toxoplasma gondii*.

A apoptose modula a resposta inflamatória (CARRERO *et al.*, 2004) desempenhando papéis distintos no desenvolvimento (DAS *et al.*, 1999) ou na cura (CONCEIÇÃO SILVA *et al.*, 1998) da lesão provocada pela *Leishmania ssp*. Os parasitos interagem com múltiplos sistemas regulatórios para tornar sua célula hospedeira refratária a apoptose durante as fases críticas da infecção incluindo a invasão celular, estabilização e multiplicação do patógeno (CARMEN e SINAI, 2007). Os mediadores responsáveis por esta modulação são desconhecidos. Além disto, existem evidências que apontam a ocorrência de apoptose em outros elementos celulares e até mesmo do próprio parasito como forma de controle populacional ou devido a restrições nutricionais (KNIGHT *et al.*, 2002; LINDOSO *et al.*, 2004). Entretanto, os mecanismos de indução de apoptose na infecção pela leishmânia nesses estudos *in vivo* ou *in vitro*, bem como a via apoptótica envolvida, não foram ainda esclarecidos.

OBJETIVO

Caracterizar e mensurar a apoptose na resposta inflamatória presente na pele de cães com ou sem sintomatologia da Leishmaniose Visceral canina.

MATERIAL E MÉTODO

O projeto para a realização deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (protocolo nº 198/2007).

Foram utilizados 75 animais sendo 31 sintomáticos, 21 oligosintomáticos e 23 assintomáticos. Os cães utilizados no experimento foram examinados e considerados ou não portadores inaparentes quanto aos seus parâmetros clínicos. O diagnóstico de LV foi confirmado pelas análises sorológica e parasitológica. Na sorologia realizou-se detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por meio de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA.

Para análise parasitológica foram feitos imprints em lâminas da medula óssea, linfonodo, baço, fígado e pele, que depois de fixados com metanol e corados com Giemsa foram examinados em microscópio de luz para a observação direta do parasito sendo o resultado confirmado por meio da cultura de parasitos em meio NNN e Schneider's Insect Medium.

Os animais utilizados neste experimento foram tranqüilizados com Acepromazina 1% (0,25 mg/Kg IM; Acepran, Univet) e sob efeito de anestesia geral

com tiopental sódico 2,5% (25 mg/kg I.V; Tiopentax) realizar-se-á necrópsia completa para a coleta de fragmentos de até 5 mm de espessura de pele da região da orelha, conservados em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4 (formol tamponado). Após este procedimento, os animais foram sacrificados por overdose de tiopental sódico 7,5% (75 mg/Kg) e colhidos fragmentos de linfonodo, baço e fígado para análise histopatológica com a finalidade de observar formas amastigotas de *Leishmania* nestes órgãos. Os fragmentos foram processados segundo técnicas de rotina, cortados a 5 µm e posteriormente corados com H+E e Giemsa Lemmert.

Após anestesia, realizou-se necropsia completa para a coleta de fragmentos de até 5 mm de espessura de pele da região da orelha, conservados em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01M pH 7,4. Os fragmentos da pele foram processados segundo técnicas de rotina, cortados a 5 µm e corados com Hematoxilina-Eosina, Tricrômio de Shorr e Giemsa-Lemmert.

Parâmetros morfométricos como área, perímetro e diâmetros extremos da inflamação como também o número de infiltrados inflamatórios foram correlacionados com a sintomatologia de 36 animais sorologicamente e parasitologicamente positivos para LV sendo 12 sintomáticos, 12 assintomáticos e 12 oligosintomáticos. O estudo histomorfométrico foi feito manualmente em imagens digitalizadas mensuradas em analisador de imagens Kontron Elektronik GmbH da Zeiss, com o programa KS300 versão 2.0 e obtidas de 25 campos histológicos aleatórios em microscópio de luz com objetiva planapocromática de 10x. Nesta análise foram considerados apenas infiltrados compostos por mais de três células inflamatórias e localizados no estroma cutâneo.

A detecção "in situ" de Apoptose foi observada pelo método de TUNEL- TdT-mediated DUTp Nick End Labeling.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os sintomas estavam assim distribuídos: nos animais sintomáticos, a linfadenopatia ocorreu em 23 casos (74,19%), seguida de conjuntivite (15 casos, 48,38%), esplenomegalia (14 casos, 18,66%) e onicogrifose (11 casos, 14,67%); nos animais oligossintomáticos observou-se apenas linfadenopatia (19 casos, 90,47%) e conjuntivite (6 casos, 28,57%) e nos assintomáticos não havia nenhuma manifestação clínica. Os demais sinais clínicos avaliados obtiveram valores abaixo de 10%.

Apesar de todos os animais possuírem parasitológico positivo, a carga parasitária observada na pele era mínima nos animais sintomáticos e ausente nos assintomáticos. Esses resultados demonstram que formas amastigotas na pele de cães infectados estão presentes apenas nos animais sintomáticos, portanto, naqueles casos com doença manifesta. Isso sugere um perfil de resposta imunológica do tipo TH2, como já demonstrado anteriormente com cães (LEMOS SOUSA *et al.*, 2000).

Histologicamente, nos animais sintomáticos, observou-se infiltrado inflamatório multifocal variando de moderado a intenso, localizado ao redor dos folículos pilosos e vasos sanguíneos, assim como na região subepidérmica e,

raramente, difuso na derme (Figura 01A). Na análise morfométrica, verificou-se um total de 984 focos inflamatórios com área média de $2111,56 \mu^2$, perfazendo uma área total de perímetro de $255,85 \mu$ e de diâmetros maior e menor $62,60$ e $33,93 \mu$, respectivamente. A área média do infiltrado inflamatório obtida nos animais sintomáticos foi estatisticamente superior ao dos animais assintomáticos conforme gráfico 01. Nos animais assintomáticos, o infiltrado inflamatório, quando presente, era difuso, variando de discreto a moderado, localizado ao redor de folículos e vasos sanguíneos e, raramente, subepidérmicos (Figura 1B). Obteve-se no estudo morfométrico um total de 6120 focos inflamatórios com área média de $369,28 \mu^2$, perímetro de $103,89 \mu$ e de diâmetros maior e menor $27,28$ e $26,89 \mu$, respectivamente. Resultados similares foram observados em estudo realizado por Dos-Santos *et al.* (2004).

Inflamação na pele de cães, como observada nesse estudo, é um achado comum e, geralmente, decorre de picadas de inseto, traumatismos e outras infecções parasitárias (MOZOS *et al.*, 1999). Assim, não podemos descartar completamente que outras infecções pudessem estar contribuindo para as alterações de pele observadas nesses animais. Mas, a intensidade discreta do infiltrado dos animais assintomáticos sugere que as lesões presentes nos animais sintomáticos tenham sido induzidas pela LV.

Esses resultados mostram claramente que dentro da mesma espécie animal a leishmânia induz na pele resposta inflamatória de distribuição e intensidade distintas. Esse fato, aliado à presença de poucas amastigotas nos cães sintomáticos e ausência nos assintomáticos, pressupõe que, nesses casos, os animais são imunocompetentes, capazes de controlar a infecção ao longo do tempo como observado no modelo de camundongo infectado por *Leishmania major* (LEMOS SOUSA *et al.*, 2000).

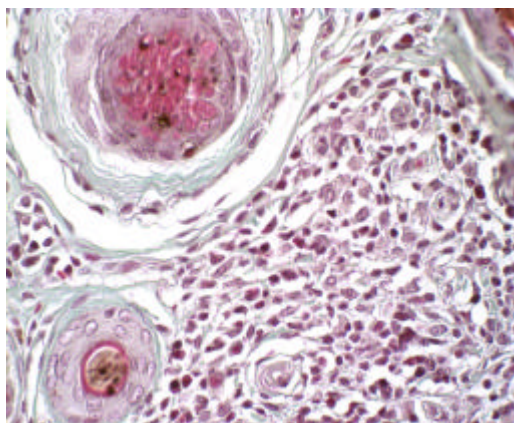


Figura 01- Micrografia de pele. Cão sintomático. Intenso infiltrado inflamatório mononuclear perifolicular. Tricrômico de Shorr. 40x.

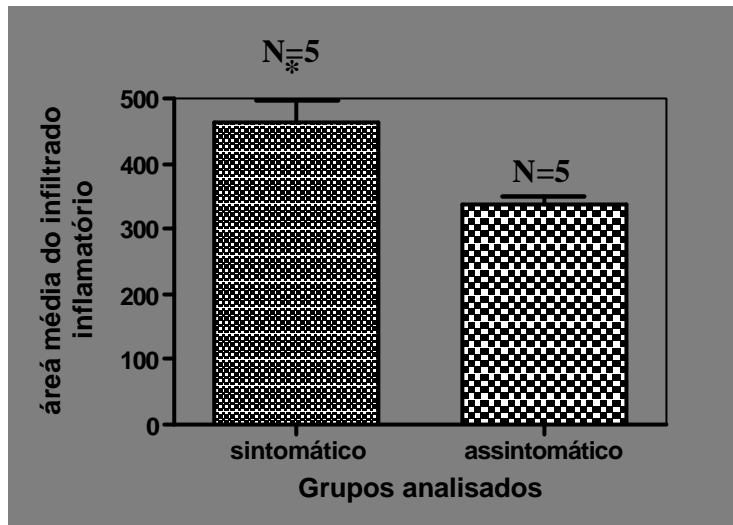


Gráfico 01- Área média do infiltrado inflamatório nos animais sintomáticos e assintomáticos na análise estatística (Mann Whitney test, *p= 0.0013).

Ocorreu apoptose na pele de todos os grupos analisados (Figura 02). Sendo esta mais freqüente nos animais assintomáticos. Nos 10 animais submetidos ao TUNEL foi observado marcação em apenas três animais sendo dois assintomáticos e um sintomático. Para a resistência a infecção é necessária a expressão de Fas-FasL provavelmente porque células TH1 expressam esta via preferencialmente e assim provocam a morte da célula hospedeira e conseqüentemente a destruição do parasito como observado na infecção por *L. major* em modelo camundongos mutantes MRL/lpr (HUANG, 1998). Este fato poderá explicar a ausência de amastigotas nos animais assintomáticos e o provável papel da apoptose nesses animais.

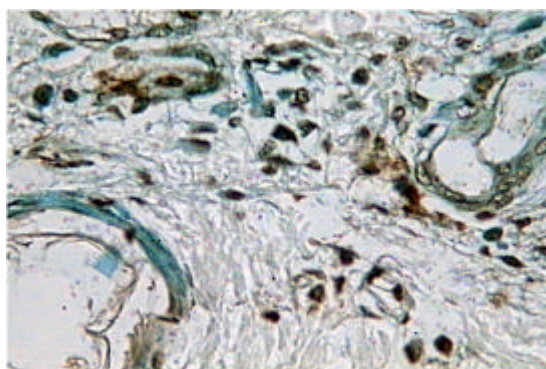


Figura 02- Micrografia de pele. (A) Cão assintomático. Intensa marcação para apoptose. TUNEL. 10x.

CONCLUSÕES

Os resultados parciais sugerem que os animais sintomáticos possuem uma resposta inflamatória mais intensa quanto comparada aos animais assintomáticos. Apesar de pouco consistentes, nossos dados sugerem que a presença de apoptose pode está mais ligada à resistência que a susceptibilidade a Leishmaniose visceral, uma vez que ocorreu em maior intensidade nos animais sem manifestação clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 345 e 522.

CARMEN, J. C.; SINAI, A. P. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. **Mol. Microbiol.**, v.64, n.4, p.904-16, 2007.

CARRERO, J. A.; CALDERON, B.; UNANUE, E. R. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduce resistances to *Listeria* infection. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 535-40, 2004.

CONCEICAO-SILVA, F.; HAHNE, M.; SCHROTER, M.; LOUIS, J.; TSCHOPP, J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n.1, p. 237-45, 1998.

DAS, G.; VOHRA, H.; RAO, K.; SAHA, B.; MISHRA, G. C. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand. J. Immunol.**, v. 49, n.3, p.307-10, 1999.

DOS-SANTOS, W.L.C.; DAVID, J.; BADARÓ, R.; DE-FREITAS, L.A.R. Association between skin parasitism and granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. **Parasitol. Res.** v. 94, p:84-94, 2004.

HUANG, F. P.; XU, D.; ESFANDIARI, E. O.; SANDS, W.; WEI, X. Q.; LIEW, F. Y. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. **J. Immunol.**, v.160, n. 9, p. 4143-7, 1998.

KNIGHT, R.A. The archaeology of apoptosis. **Cell Death Differ.**, v.9, p.1-2, 2002.

LEMOS DE SOUSA V, ASCENSÃO JS, SAMPAIO PTV, RODRIGUES DE FREITAS LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological response in CBA mice. **Microbes and infection**, v.2, n.15, p.1807-15, 2000.

LINDOSO, J. A.; COTRIM, P. C.; GOTO, H. Apoptosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. **Int. J. Parasitol.**, v.34, n.1, p.1-4, 2004.

MOZOS E, PERÉZ J, DAY MJ, LUCENA R, GINEL PJ: Leishmaniosis and generalized dermodicoses in three dogs: a clinical and immunohistochemical study. **Comp. Pathol.** v.120, p.257-268, 1999.

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

VERÇOSA, B.L.A.; GOTO, H.; SILVA, S.M.M.S.; COSTA, F.A.L. Characterization of skin inflammatory response and parasitism in naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. In: Third World Congress on Leishmaniosis, 2005, Palermo. **Third World Congress on Leishmaniosis - Abstract book**, 2005. v. 0. p. 219-219.