

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Imunohistoquímica em cães positivos para leishmaniose
visceral**

Marcel Lekevicius Costardi

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Batista Guimarães

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
FEVEREIRO, 2009

MARCEL LEKEVICIUS COSTARDI

**Imunohistoquímica em cães positivos para leishmaniose
visceral**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Saúde Animal

Dr. Eurípedes Batista Guimarães
Orientador

Dr. Olímpio Crisóstomo Ribeiro

Dr. Renato de Lima Santos

*...Hey man of science with your perfect rules of measure
Can you improve this place with the data that you gather?...*
Brett Gurewitz

Dedico o trabalho a minha família, namorada e ao orientador.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Professores Eurípedes Batista Guimarães, Ricardo Antonio Amaral de Lemos, Carlos Eurico dos Santos Fernandes e Ana Luiza Alves Rosa Osório pelos ensinamentos, conselhos e orientações.

Aos alunos do mestrado em Ciência Animal Ana Paula Antunes Nogueira, Ariane Pereira Benites, Eurico A. Sczesny-Moraes, Roosevelt Isaias carvalho Souza, Suzamar Gomes Cardinal e Joyce Katiuccia Medeiros Ramos Carvalho por tudo que passamos durante o desenvolvimento de nossos trabalhos.

A equipe técnica do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A Rodrigo Marino.

E um agradecimento especial a Yasmin El Hayek.

SUMÁRIO

“Página”

RESUMO	08
Abstract	08
1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1 Distribuição e taxonomia	09
1.2 Ciclo Biológico	09
1.3 Papel dos cães na epidemiologia.....	10
1.4 Sinais clínicos e perfis laboratoriais	10
1.5 Alterações anátomo-patológicas	11
1.6 Diagnóstico	12
1.7 Controle da leishmaniose	13
2. OBJETIVO	13
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	14
4. ARTIGO	17
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO	18
MÉTODOS	20
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alaninaminotransferase
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática)
FA	Fosfatase alcalina
IHQ	Imunohistoquímica
LCS	Linfonodos Cervicais Superficiais
LM	Linfonodos Mandibulares
LP	Linfonodos Poplíteos
LVC	Leishmaniose visceral canina
PBS	<i>Phospate Buffered Saline</i> (Solução Salina Fosfatada Tamponada)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

RESUMO

OBJETIVO: O estudo objetivou a determinação do tecido de eleição para o diagnóstico imunohistoquímico da Leishmaniose visceral canina.

MÉTODOS: Examinaram-se amostras obtidas em 40 cadáveres de cães positivos para leishmaniose visceral pelos testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio de adsorção enzimática (ELISA), eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, MS. Os cadáveres de 20 animais que em vida manifestavam pelo menos três sinais da doença formaram um grupo denominado de grupo 1, enquanto os animais clinicamente normais formaram o grupo 2. Amostras da pele da ponta da orelha; linfonodos mandibulares, cervicais superficiais e poplíteos; fígado e baço colhidas. Processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina, microtomizada, um fragmento foi submetido à marcação imunohistoquímica específica e examinada em microscópio de luz.

RESULTADOS: A imunohistoquímica possibilitou a confirmação da doença em todos os animais positivos. Os animais do grupo sem sinais a marcação na pele foi menor do que nos demais tecidos. No grupo com sinais, os três linfonodos e fígado mostraram maior sensibilidade à imunohistoquímica.

CONCLUSÕES: Os resultados permitiram concluir que os linfonodos são os órgãos de eleição para o diagnóstico da LVC pelo método de imunohistoquímica.

DESCRIPTORIOS: *Leishmania* sp., diagnóstico, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to look for the most sensitive tissue for diagnose of canine visceral leishmaniasis using immunohistochemistry.

Method: Forty serologic positive cadavers of dogs diagnosed by indirect immunofluorescence and enzyme linked immuno sorbent assay were euthanatized and provided by the Zoonosis Control Center of Campo Grande, MS. Dogs showing at least three signs of the disease were assigned as group 1 and dog without signs as group 2. Samples of skin, liver, spleen and mandibular, cervical and popliteal lympho nodes were harvested and fixed in 10% neutral buffered formalin for immunohistochemical examination under an optical microscope.

Results: All animals were positive for leishmaniasis by immunohistochemical examination. The skin samples of the apparently healthy animals (group 2) showed lower positivity

compared to other examined tissue. Among dogs with clinical signs data showed higher sensibility in the lympho nodes and liver.

Conclusion: Data obtained in this study allowed to conclude that the most sensitive tissue for immunohistochemistry procedure are the lympho nodes.

DESCRIPTORS: *Leishmania* sp., diagnostic, immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Distribuição e taxonomia

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose multissistêmica causada por um protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, da classe Zoomastigofora, e ordem *Cinetoplastidae* (Tesh, 1995), com 3 espécies patogênicas pertencentes ao complexo Donovanii sendo *L. Chagasi*, *L. Infantum* e *L. donovani*. No Brasil a espécie responsável pela doença é a *Leishmania chagasi* (Abranches et al., 1991). A doença é endêmica em 88 países (Rallis et al., 2005), distribuída na América Central, África, Sul da Europa, Ásia e Oriente (Marsden, 1979) com uma incidência estimada de 500.000 casos por ano em todo mundo (WHO, 2008; www.who.int). O Brasil detém 90% dos casos notificados no continente americano (Monteiro et al., 1994). A enfermidade se desenvolve em hospedeiros mamíferos (Desjeux, 2004), causando lesões cutâneas ou envolvimento visceral generalizado (NSP/VPP, 2002). A leishmaniose visceral atualmente tem maior importância que a tegumentar por ser mais comum e frequentemente fatal quando não tratada (Desjeux, 2004).

1.2 Ciclo biológico

Esta doença é uma importante zoonose, cujo agente tem os cães como o principal reservatório doméstico. Eles se comportam como hospedeiro para a forma amastigota do protozoário, sendo capazes de infectar o flebótomo hematófago *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, que em seu intestino o parasita se multiplica, tornando-se infectante a partir de 8 a 20 dias (Desjeux, 2004). O flebótomo suga e infecta os humanos (Anderson et al., 1980; Abranches et al., 1991). A *L. longipalpis* é uma mosca hematófaga frequentemente encontrada na zona rural ou urbana, com grande capacidade de adaptação ao convívio com seres humanos e animais domésticos (De Oliveira et al., 2008). O ciclo da leishmaniose visceral se resume a duas grandes entidades epidemiológicas: (1) nas Américas e na Europa se trata de uma zoonose, causada pelas espécies *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum*, isto

é uma doença de animais transmissível ao homem, e vice-versa e (2) Na Índia, é uma antroponose, causada pela *Leishmania donovani*, onde o homem é a própria fonte de infecção do vetor (Desjeux, 2004).

1.3 Papel dos cães na epidemiologia

A leishmaniose costumava ser endêmica nas áreas rurais e peri-urbanas, entretanto com o aparecimento de focos em grandes centros urbanos, assumiu uma importância maior na saúde pública (Diniz *et al.*, 2008). O intenso parasitismo da pele, inclusive de animais assintomáticos, faz do cão o principal reservatório da *Leishmania* sp. (Abranches *et al.*, 1991; Giunchetti *et al.*, 2006). Entretanto, Tufuri *et al.*, (2001) relataram um caso de leishmaniose visceral canina com presença de formas amastigotas em fragmentos de fígado, baço, linfonodos, rins, medula óssea e pulmões, mas as amostras de pele de múltiplas regiões do corpo do animal mostraram apenas discreto infiltrado inflamatório, sem a presença de formas amastigotas (Tufuri *et al.*, 2001). Ao se comparar os parâmetros microscópicos observados nos tecidos de animais assintomáticos com os de cães sintomáticos, foi observado maior parasitismo na pele de animais que apresentaram sinais clínicos da doença (Giunchetti *et al.*, 2008). Em todos os animais infectados, tanto assintomáticos, como oligossintomáticos e sintomáticos, o infiltrado inflamatório era predominantemente de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Giunchetti *et al.*, 2006).

1.4 Sinais clínicos e perfis laboratoriais

Clinicamente, a leishmaniose pode manifestar-se de formas variáveis e o tipo de síndrome resultante da infecção é determinado pela reação imune do hospedeiro, cujos sinais clínicos são de uma doença de evolução lenta. As síndromes variam desde lesões cutâneas autolimitantes até doença sistêmica fatal. Os sinais dermatológicos da leishmaniose visceral são mais comumente localizados na face e orelhas mais podem apresentar-se, em casos mais severos, em todo o corpo do animal e consistem de descamação epitelial, seborréia, alopecia, ulceração da pele e onicogribose. Os órgãos geralmente afetados são baço, fígado, linfonodos, medula óssea. Processos inflamatórios oculares também podem ocorrer, entre eles a blefarite, conjuntivite, ceratite, uveíte, retinite e endoftalmite (Neta *et al.*, 2007). Um caso de osteomielite causada por leishmaniose foi relatado no Brasil sendo esse um sinal clínico incomum no entanto possível de ocorrer (Souza *et al.*, 2005). Na forma visceral severa, a temperatura corporal é geralmente normal, no entanto podem ocorrer episódios recorrentes de hipertermia, com temperatura corporal atingindo entre 40-40,5°C. Há manifestações de fraqueza, emaciação, diarreia, epistaxe, claudicação, edema das patas, ulceração, inflamação

ocular que pode evoluir para cegueira, linfadenomegalia e hepato-esplenomegalia (Keenan, *et al.*, 1984a; Ciaramella *et al.*, 1997; NSP/VPP, 2002).

Os achados laboratoriais mais comumente encontrados são anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia, leucocitose, neutrofilia, alta concentração de proteínas plasmáticas totais, hipoalbuminemia e moderada a severa hiperglobulinemia com aumento das frações alfa globulina 1 e 2, beta globulina e gama globulina, aos 41 dias pós infecção. Com 82 dias ocorre aumento mais acentuado das alfa globulinas 1 e 2. Pode ocorrer aumento moderado de enzimas hepáticas fosfatase alcalina (FA) e alaninaminotransferase (ALT), e em animais com falência renal as concentrações de uréia e creatinina podem estar elevadas (Keenan, *et al.*, 1984a; Ciaramella *et al.*, 1997). No entanto, 55 a 82 dias após a infecção, pode ocorrer linfocitose associado a parâmetros leucocitários normais ou discretamente diminuídos (Keenan, *et al.*, 1984a).

Os isotipos de imunoglobulinas reativas anti-*Leishmania* são IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE. Os animais com carga parasitária moderada a severa apresentam níveis de IgG elevados (Reis *et al.*, 2006a).

A avaliação do perfil leucocitário de animais com diferentes manifestações clínicas revelou que os assintomáticos e oligossintomáticos apresentam quantidades absolutas de linfócitos T (CD5+) mais elevada que os sintomáticos (Reis *et al.*, 2006b).

1.5 Alterações anátomo-patológicas

À necropsia de animais com LVC clínica, os achados externos incluem emaciação, lesões cutâneas e onicogrifose. Internamente, há aumento de volume do fígado, baço e linfonodos e os rins podem revelar palidez da cortical. Na maioria dos casos, a medula óssea apresenta-se hiperplásica (Keenan, *et al.*, 1984b; NSP/VPP, 2002). O grande número de granulomas intralobulares, assim como o intenso infiltrado inflamatório portal e da cápsula hepática, pode bloquear o fluxo sangüíneo representando a base histológica da hepatomegalia (Giunchetti *et al.*, 2008). Em humanos, as lesões são muito semelhantes às observadas nos cães, no entanto, em alguns casos, há de fibrose e cirrose hepática (El Hag *et al.*, 1994).

Microscopicamente, as alterações hepáticas freqüentemente encontradas em animais portadores de LVC se caracterizam pela presença de granulomas intralobulares de tamanhos variados, constituídos por aglomerados de macrófagos, parasitados ou não com a forma amastigota de *L. chagasi*, associados com células epitelióides, poucos linfócitos e plasmócitos, e raros neutrófilos. Outro achado freqüentemente observado é a hipertrofia e

hiperplasia das células de kupffer, assim como exudato linfo-histiocitário no espaço porta e cápsula hepática (Tafuri *et al.*, 2001; Giunchetti *et al.*, 2008).

No baço, ocorre reação inflamatória crônica na cápsula esplênica, região subcapsular, sistema trabecular e polpa vermelha. Há adelgaçamento da cápsula e congestão. A polpa vermelha evidencia alta celularidade e alterações morfológicas devido a proliferação de macrófagos e a presença de granulomas (Keenan, *et al.*, 1984b; Tafuri, *et al.*, 2001; Santana *et al.*, 2008).

A linfadenomegalia generalizada é uma característica marcante da LVC, (Tafuri *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2004; Giunchetti *et al.*, 2008). O exame histológico de linfonodos de cães positivos revela que a zona cortical do linfonodo poplíteo, evidencia depleção das células foliculares e substituição dos linfócitos por macrófagos (Giunchetti *et al.*, 2008). Os animais assintomáticos e oligossintomáticos apresentam hipertrofia e hiperplasia desta zona, enquanto os órgãos de animais sintomáticos apresentam, predominantemente, atrofia. Na região medular, há a presença de macrófagos com citoplasma repleto de formas amastigotas (Tafuri *et al.*, 2001).

A LVC pode acometer órgão como os rins, pulmão e medula óssea, causando glomerulonefrite, pneumonia intersticial crônica difusa e hiperplasia da medula óssea respectivamente. Em alguns casos, as tonsilas podem apresentar alterações semelhantes às observadas nos linfonodos (Keenan *et al.*, 1984b; Tafuri *et al.*, 2001).

Na pele, as alterações macroscópicas presentes em animais doentes são caracterizadas por dermatite esfoliativa seca, alopecia com hiperqueratose e, em muitos casos, também ulcerações. Microscopicamente, é comum se observar tanto atrofia como hiperplasia da epiderme, hipermelanose e edema. Há também foliculite, degeneração, atrofia ou displasia folicular, bem como inflamação atrofia ou ausência de glândulas sebáceas. Ainda é relatado dermatite perivascular ou intersticial, superficial e profunda (Saridomichelakis *et al.*, 2007). Amostras de pele sem lesões macroscópicas, provenientes de animais sintomáticos, na sua maioria, podem apresentar junto com alterações microscópicas, grande quantidade de formas amastigotas. Já o mesmo tipo de exame em amostras de pele de animais portadores assintomáticos, geralmente revela carga parasitária menor (Solano-Galego *et al.*, 2004).

1.6 Diagnóstico

Vários métodos de diagnóstico são preconizados. Dentre os diretos, destacam-se o exame microscópio de *imprints* corados com Giemsa, a histopatologia, a imunohistoquímica (IHQ), o cultivo e isolamento do agente em animais de laboratório, o xenodiagnóstico, a

reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR em tempo real. Dentre métodos indiretos, são comumente empregados a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio de imunodifusão, o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), o *western blotting* e a Citometria de fluxo (Maia e Campino, 2008). A histopatologia pode ser utilizada para diagnóstico definitivo da LVC através da detecção microscópica do parasita, no entanto apresenta limitações, como demora operacional e a dificuldade de reconhecimento do parasita (Xavier *et al.*, 2006). A IHQ pode ser empregada como ferramenta complementar para a confirmação do diagnóstico, principalmente quando a carga parasitária é baixa ou quando as alterações histológicas, apesar de sugerirem a doença, não evidenciam o parasita (Tafari *et al.*, 2004; Maia e Campino, 2008). Entretanto para a realização da IHQ os laboratórios veterinários devem ter seus protocolos padronizados e controlados em todas as etapas para que com isso os erros na interpretação de resultados não ocorram (Ramos-Vara *et al.*, 2008).

1.7 Controle da Leishmaniose

As principais medidas de controle da leishmaniose são baseadas no diagnóstico, tratamento dos pacientes, controle de vetores e controle de animais reservatórios. No Brasil, a eliminação de cães infectados foi associada com o decréscimo da prevalência da doença em humanos (Palatnik-De-Sousa *et al.*, 2001). O tratamento de cães não é uma ferramenta interessante no controle da leishmaniose visceral uma vez que animais tratados podem ter sua carga parasitária aumentada apesar de aparentar cura (WHO, 2008; www.who.int). As estratégias de controle para vetores são baseadas no comportamento da *Lutzomia longipalpis*, sendo utilizados principalmente os inseticidas (Desjeux, 2004). Os exames utilizados nos programas de controle de leishmaniose visceral em áreas endêmicas no Brasil são ELISA e RIFI e alguns pesquisadores relatam a ocorrência de reação cruzada com erlichiose e babesiose (Mancianti *et al.*, 1996), no entanto, outros autores afirmam não ocorrerem tais reações (Oliveira *et al.*, 2008).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo eleger entre linfonodos (mandibular, cervical e poplíteo), fígado, baço e pele, o tecido mais eficiente para a detecção de formas amastigota através da imunohistoquímica, utilizando amostras colhidas de cães infectados naturalmente com *Leishmania* sp., com e sem a presença de sinais clínicos.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches, P., M. C. Silva-Pereira, *et al.* Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J Parasitol**, v.77, n.4, , p.557-61. Aug 1991.

Anderson, D. C., R. G. Buckner, *et al.* Endemic canine leishmaniasis. **Vet Pathol**, v.17, n.1, p.94-6. Jan 1980.

Ciaramella, P., G. Oliva, *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec**, v.141, n.21, 22, p.539-43. Nov 1997.

De Oliveira, A. G., A. M. Marassa, *et al.* Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Trop**, v.107, n.3, p.238-41. Sep 2008.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.27, n.5, , p.305-18. Sep 2004.

Diniz, S. A., Silva, F. L., *et al.* Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **J Infect Developing Countries**, 2(1), 24-33, Jan 2008.

El Hag, I. A., F. A. Hashim, *et al.* Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **J Clin Pathol**, v.47, n.6, p.547-51. Jun 1994.

Giunchetti, R. C., O. A. Martins-Filho, *et al.* Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v.121, n.1-2, , p.23-33. Jan 2008.

Giunchetti, R. C., W. Mayrink, *et al.* Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v.84, n.2, , p.269-77. Apr 2008.

Giunchetti, R. C., W. Mayrink, *et al.* Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **J Comp Pathol**, v.135, n.2-3, , p.100-7. Aug-Oct 2006.

Keenan, C. M., L. D. Hendricks, *et al.* Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Pathology. **Vet Pathol**, v.21, n.1, p.74-79. Jan 1984

Keenan, C. M., L. D. Hendricks, *et al.* Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. **Vet Pathol**, v.21, n.1, p.80-6. Jan 1984.

Lima, W. G., M. S. Michalick, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Trop**, v.92, n.1, p.43-53. Sep, 2004.

Maia, C. e L. Campino. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol.** Aug 2008.

Mancianti, F., F. Pedonese, *et al.* Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Vet Parasitol**, v.65, n.1-2, p.1-9. Oct ,1996.

Marsden, P. D. Current concepts in parasitology. Leishmaniasis. **N Engl J Med**, v.300, n.7, p.350-2. Feb, 1979.

Monteiro, S. P., Lacerda, M.M. *et al.* Controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Ver Soc Bras Med Trop**, 27, 67-72. Jun, 1994.

Neta, A. V. C., Paixão, T. A., *et al.* Pan-oftalmite em cão com leishmaniose visceral: relato de caso. **Clin. Vet**, 66, 52-56, 2007.

NSP/VPP- National Security Education Program/Voluntary Protection Program – Leishmaniosis (2002). LEISHMANIOSE EM CAES, disponível em <http://www.vet.uga.edu/vpp/nsep/Brazil2002/leishmania/Port/Leish02.htm>.

Oliveira, T. M., P. I. Furuta, *et al.* A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.17, n.1, p.7-11. Jan-Mar, 2008.

Palatnik-De-Sousa, C. B., W. R. Dos Santos, *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.65, n.5, p.510-7. Nov, 2001.

Rallis, T., M. J. Day, *et al.* Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **J Comp Pathol**, v.132, n.2-3, p.145-52. Feb-Apr, 2005.

Ramos-Vara, J. A., *et al.* Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J. Vet. Diagn. Invest.** 20: 393-413, 2008.

Reis. A. B. Teixeira-Carvalho, A. Isotypes patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 112, p. 102-116. Feb., 2006.

Reis. A. B., Teixeira-Carvalho, A. Phenotypic features of circulation leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **J Compil**, v. 146, p. 303-311. 2006.

Santana, C. C., Vassalo, J *et al.* Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasit Immunol**, v. 30, p. 515-524. Mai, 2008.

- Saridomichelakis M. N., Koutinas A. F *et al.* Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **J Compil**, 18: 227-233. Apr, 2007
- Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, *et al.* Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs. **J Comp Pathol**, 130: 7-12, 2004
- Souza, A. I., Juliano, R. S., *et al.* Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. **Vet Parasitol**, 129: 51-54, 2005.
- Tafari, W. L., M. R. De Oliveira, *et al.* Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet Parasitol**, v.96, n.3, p.203-12. Apr, 2001.
- Tafari, W. L., R. L. Santos, *et al.* An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J Immunol Methods**, v.292, n.1-2, p.17-23. Sep, 2004.
- Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 287-92.
- Xavier, S. C., H. M. De Andrade, *et al.* Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BMC Vet Res**, v.2, p.17. 2006.

Imunohistoquímica em cães positivos para leishmaniose visceral

Immunohistochemistry in dogs with visceral leishmaniasis

Marcel L. Costardiⁱ, Eurípedes B. Guimarãesⁱⁱ

RESUMO

OBJETIVO: O estudo objetivou a determinação do tecido de eleição para o diagnóstico imunohistoquímico da Leishmaniose visceral canina.

MÉTODOS: Examinaram-se amostras obtidas em 40 cadáveres de cães positivos para leishmaniose visceral pelos testes de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio de adsorção enzimática (ELISA), eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, MS. Os cadáveres de 20 animais que em vida manifestavam pelo menos três sinais da doença formaram um grupo denominado de grupo 1, enquanto os animais clinicamente normais formaram o grupo 2. Amostras da pele da ponta da orelha; linfonodos mandibulares, cervicais superficiais e poplíteos; fígado e baço colhidas. Processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina, microtomizadas a 4µm, um fragmento foi submetido à marcação imunohistoquímica específica e examinada em microscópio de luz.

RESULTADOS: A imunohistoquímica possibilitou a confirmação da doença em todos os animais positivos. Os animais do grupo sem sinais a marcação na pele foi menor do que nos demais tecidos. No grupo com sinais, os três linfonodos e fígado mostraram maior sensibilidade à imunohistoquímica.

CONCLUSÕES: Os resultados permitiram concluir que os linfonodos são os órgãos de eleição para o diagnóstico da LVC pelo método de imunohistoquímica.

DESCRITORES: *Leishmania* sp., diagnóstico, imunohistoquímica.

Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS. ² Laboratório de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), UFMS. Apoio financeiro Fundect.

Correspondência | Correspondence:: Eurípedes Batista Guimarães. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Cidade Universitária s/n, Cx. Postal 549, 79074-460, Campo Grande, MS, Brasil.

Telefone: 55 67 3345-3615; Fax: 55 67 3345-3600; e-mail: ebg@nin.ufms.br

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to look for the most sensitive tissue for diagnose of canine visceral leishmaniasis using immunohistochemistry.

Method: Forty serologic positive cadavers of dogs diagnosed by indirect immunofluorescence and enzyme linked immuno sorbent assay were euthanatized and provided by the Zoonosis Control Center of Campo Grande, MS. Dogs showing at least three signs of the disease were assigned as group 1 and dog without signs as group 2. Samples of skin, liver, spleen and mandibular, cervical and popliteal lympho nodes were harvested and fixed in 10% neutral buffered formalin for immunohistochemical examination under an optical microscope.

Results: All animals were positive for leishmaniasis by immunohistochemical examination. The skin samples of the apparently healthy animals (group 2) showed lower positivity compared to other examined tissue. Among dogs with clinical signs data showed higher sensibility in the lympho nodes and liver.

Conclusion: Data obtained in this study allowed to conclude that the most sensitive tissue for immunohistochemistry procedure are the lympho nodes.

DESCRIPTORS: *Leishmania* sp., diagnostic, immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

Leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença multissistêmica causada pelo protozoário, *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, endêmica em várias regiões do mundo¹⁸. A enfermidade se desenvolve no homem e nos cães, causando lesões cutâneas e envolvimento visceral generalizado¹⁶. O acometimento visceral é importante por ser freqüentemente fatal quando não tratado⁷. É considerada uma importante zoonose, onde os cães têm um marcante papel epidemiológico, por serem hospedeiro para a forma amastigota do protozoário, que infecta o flebótomo *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*, uma mosca hematófaga altamente adaptável ao convívio com animais domésticos e com seres humanos⁶, nos quais realizam sugaduras, infectando-os^{1,2}. O intenso parasitismo da pele, inclusive de animais assintomáticos, faz do cão o principal reservatório da *leishmania* sp.^{1, 9,11}. Entretanto Tafuri et al. (2001)²³ relatou um caso de leishmaniose visceral com presença de

formas amastigotas em múltiplos órgãos, cujas amostras de pele de diversas regiões do corpo apresentou apenas discreto infiltrado inflamatório, sem a presença do parasita.

Clinicamente, a LVC pode se manifestar de formas variáveis e, o tipo de síndrome resultante da infecção, é determinada pela reação imune do hospedeiro. Os sinais predominantemente são de uma doença com evolução lenta, variando de animais assintomáticos, aparentemente saudáveis, a cães apresentando lesões cutâneas autolimitantes até comprometimento sistêmico fatal. Os sinais de comprometimento dermatológicos consistem de descamação, seborréia, alopecia, ulceração, onicogribose, geralmente com distribuição simétricas. Na forma visceral severa, a temperatura corporal geralmente é normal ou sub-normal, podendo haver manifestação de fraqueza, emaciação, diarreia, epistaxe, claudicação, anemia, edema das patas, ulceração cutânea, inflamação ocular que pode levar a cegueira, linfadenomegalia e hepato-esplenomegalia¹⁶.

À necropsia de animais com LVC clínica, os achados incluem emaciação, lesões cutâneas e aumento de volume dos linfonodos, baço e fígado. Os rins podem revelar palidez da cortical e na maioria dos casos, a medula óssea apresenta-se aumentada¹⁶. Em humanos, as lesões são semelhantes às observadas nos cães, no entanto, em alguns casos, há também presença de fibrose e cirrose hepática⁸.

Microscopicamente no fígado, há presença de granulomas intralobulares de dimensões variadas, constituídos de aglomerados de células epitelióides e macrófagos, parasitados ou não com a forma amastigota de *L. chagasi*. Há poucos linfócitos, plasmócitos e raros neutrófilos. Outro achado freqüente é a hipertrofia e hiperplasia das células de kupffer, assim como um exudato linfo-histiocitário no espaço porta e cápsula hepática^{10,23}. O grande número de granulomas intralobulares assim como o intenso infiltrado inflamatório portal e da cápsula hepática, podem bloquear o fluxo sanguíneo representando a base histológica para a hepatomegalia¹⁰.

No baço, ocorre reação inflamatória crônica na cápsula esplênica, região subcapsular, sistema trabecular e polpa vermelha. Há adelgaçamento da cápsula e o órgão linfóide se apresenta congesto. A polpa vermelha evidencia proliferação de macrófagos e presença de granulomas²³.

A linfadenomegalia generalizada é uma característica marcante da LVC^{9,12}. O exame histológico de linfonodos de cães positivos evidencia uma cortical com desorganização de estruturas foliculares e hiperplasia dos linfócitos e macrófagos. Na região medular, há a presença de macrófagos com citoplasma repleto de formas amastigotas do parasita²³.

A histopatologia pode ser utilizada para diagnóstico definitivo da LVC através da detecção microscópica do parasita, no entanto apresenta limitações, como demora operacional e dificuldade de reconhecimento do parasita¹¹. A IHQ é empregada como ferramenta complementar para a confirmação do diagnóstico, principalmente quando a carga parasitária é baixa ou quando as alterações histológicas, apesar de sugerirem a doença não evidenciam o parasita^{13,24}.

Com relação ao controle, em áreas endêmicas do Brasil, a eutanásia de cães sorologicamente positivos foi relacionada a diminuição na prevalência de leishmaniose humana¹⁷.

O presente trabalho teve como objetivo eleger o tecido, em cães sorologicamente positivos, infectados naturalmente com *Leishmania sp*, com e sem a presença de sinais clínicos, e que seja eficiente para marcação de formas amastigotas através da imunohistoquímica.

MÉTODOS

Examinaram-se amostras obtidas em 40 cadáveres de caninos adultos, de ambos os sexos, disponibilizados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Todos pertenciam a animais positivos para *Leishmania sp* através dos testes sorológicos de RIFI (Biomanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), considerado exame sorológico padrão ouro para diagnóstico de *Leishmania sp*.^{9,19}, e de ELISA(enzyme linked immunonoSorbent assay) (Biomanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os cadáveres dos animais doentes e eutanasiados³ foram selecionados de acordo com os sinais clínicos registrados em vida, e separados em dois grupos. O primeiro grupo, ou sintomático, foi composto de 20 animais, que em vida, apresentaram pelo menos três sinais clínicos sugestivos de LVC tais como, emagrecimento severo, palidez de mucosas, dermatite esfoliativa seca, alopecia, hiperqueratose, úlceras de pele ou mucosas, onicogribose e linfadenopatia⁵, e o segundo, também com 20 animais, clinicamente isentos de tais sinais, referido como assintomáticos. A ocorrência de

linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia foi confirmada através do exame post-mortem conduzido na sala de necropsia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Amostras colhidas da pele, em um ponto fixo, pré-determinado da extremidade da orelha; linfonodos mandibulares (LM), cervicais (LCS) e poplíteos (LP), fígado e baço foram fixadas em solução de formol a 10%, neutro e tamponado por no máximo 48 horas. Processadas as amostras pela técnica rotineira de inclusão e blocagem em parafina^{4,25}, os blocos foram submetidos à microtomia, para obtenção de secções de tecidos, com espessura de 4 µm. Na seqüência, uma lâmina de cada bloco foi submetida à marcação imunohistoquímica, de acordo com protocolo preconizado por Tafuri (2004)²⁴.

Para a marcação imunohistoquímica, as lâminas, depois de desparafinadas, foram hidratadas e incubadas com peróxido de hidrogênio a 4%, e em seguida lavadas em solução salina fosfatada tamponada (PBS), incubadas com 0,26g leite em pó desnatado (Molico®) diluído em 10ml de água destilada, seguido por lavagem em PBS. Como anticorpo primário, utilizou-se soro sanguíneo de cão positivo para *L. chagasi*, com titulação de 1:1280, diluído a 1:100 em PBS, no qual as lâminas foram incubadas por 20-22 horas em câmara úmida na temperatura de 4 °C. Após incubação, as lâminas eram lavadas com PBS e incubadas com biotinylated-link (Dako, Califórnia - EUA) por 30 minutos, lavadas novamente com PBS e incubadas por 30 minutos com streptavidin-HRP (Dako, Califórnia - EUA) em temperatura ambiente. A reação era desencadeada com solução cromógena de diaminobenzidine (Dako, Califórnia - EUA) por 5 minutos e então lavados com 3 banhos consecutivos em água destilada por 5 minutos. Em seguida, os cortes eram corados com hematoxilina por 45 segundos e lavados em água corrente, por 5 minutos. As lâminas eram desidratadas, diafanizadas e em seguida montadas com entelan e lamínulas²⁴.

As lâminas prontas, foram examinadas em microscopia de luz com objetivas 100 e 400X. Os exames eram interpretados como positivos através da marcação em cor marrom, de formas amastigotas no interior de macrófagos do sistema fagocitário mononuclear (Fig.1 e 2).

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o programa computacional Biostat® 2008 profissional e Instat® e submetidos ao teste exato de

Fisher e ao teste não paramétrico de Cochran para comparação da diferença entre as porcentagens de positividade das amostras estudadas.

RESULTADOS

Os sinais clínicos de LVC observados nos animais do grupo I, sintomáticos foram: dermatite esfoliativa seca (85%); alopecia (70%); anemia (65%); hiperqueratose (65%); onicogribose (60%) e úlceras de pele (20%). Quanto à condição corporal, 55%, apresentaram estado geral ruim, 40% regular e somente 5% tinha condição corporal boa. À necropsia, 85% dos casos revelou linfadenomegalia; 45%, hepatomegalia e 55%, esplenomegalia.

Quanto aos animais do grupo II, 90% deles apresentaram condição corporal boa e somente 10% evidenciaram estado geral regular. A manifestação clínica, por ventura observada em alguns animais desse grupo foi, anemia em 5% e, à necropsia, observou-se que 10% dos cadáveres apresentaram linfadenomegalia e 15%, esplenomegalia.

Quando as amostras foram submetidas à imunohistoquímica, todos os animais revelaram marcação em pelo menos um tecido e, com exceção de um do grupo assintomático, cujos linfonodos não revelaram marcação, evidenciando positividade somente na pele e no baço. Os resultados estão expressos na Tabela 1. No grupo 1 ou sintomáticos, a maior positividade à IHQ ocorreu nos linfonodos cervicais superficiais, onde 90% deles mostraram forte marcação de formas amastigotas do parasita, caracterizada pela presença agregados marrom no interior de macrófagos (Figura 1). Este quadro se repetiu em 85% dos LPs, 80% dos LMs, 75% dos fígados e baços e 60% das amostras de pele.

Os resultados obtidos nos testes de imunohistoquímica, nas amostras de tecidos dos animais do grupo II, assintomáticos, expressos (Tab 1), revelam que, a maior positividade, com marcação semelhante à observadas nos tecidos dos animais do grupo I (Figura 2), coube aos LCs (90%), seguida dos LPs (85%), LMs (80%), baço (75%), fígado (60%) e pele (15%).

Tabela 1 - Imunohistoquímica para Leishmaniose Visceral Canina, em diferentes tecidos, de 40 cães positivos nos testes sorológicos de RIFI e ELISA, com e sem sinais clínicos da doença e eutanasiados no CCZ de Campo Grande, MS

Tecidos	Resultados positivos – (%)	
	Grupo 1-sintomáticos (n=20) - Grupo 2-assintomáticos (n=20)	
LM	18 – (90)	16 – (80)
LCS	16 – (80)	18 – (90)
LP	17 – (85)	17 – (85)
LM+LCS+LP	20 – (100)	19 – (95)
Pele	12 – (60) ^A	3 - (15) ^B
Fígado	15 – (75)	12 – (60)
Baço	15 – (75)	15 – (75)

Letras A e B na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,007$)

LM=Linfonodo mandibular; LCS=Linfonodo cervical superficial; LP=Linfonodo poplíteo;
LM+LCS+LP=Resultado obtido em pelo menos um dos três linfonodos

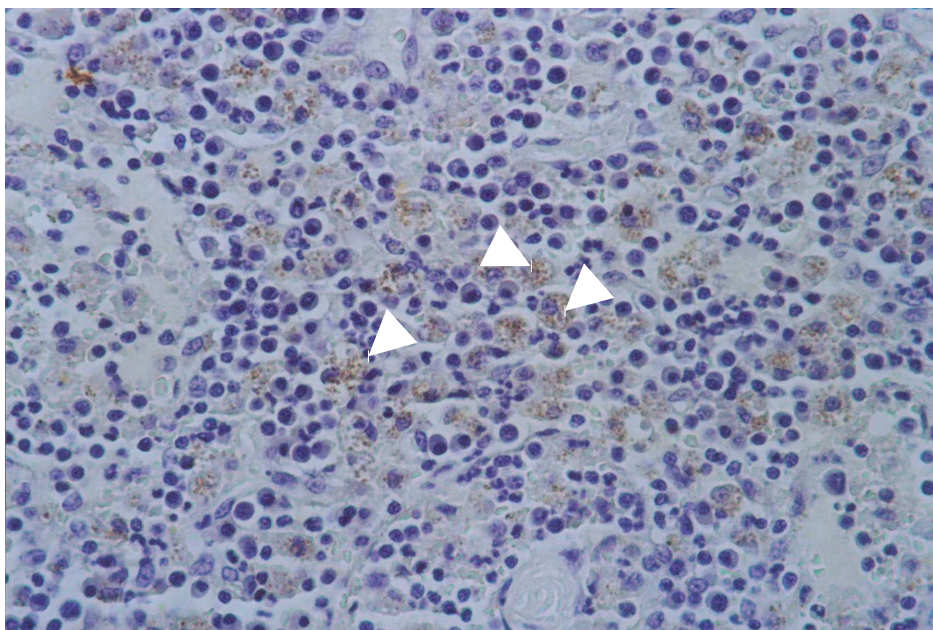


Figura 1- Linfonodo mandibular de animal positivo sintomático; Múltiplos macrófagos com citoplasma carregado de agregados marrom = Forma amastigota de *Leishmania* sp.(cabeça de seta)

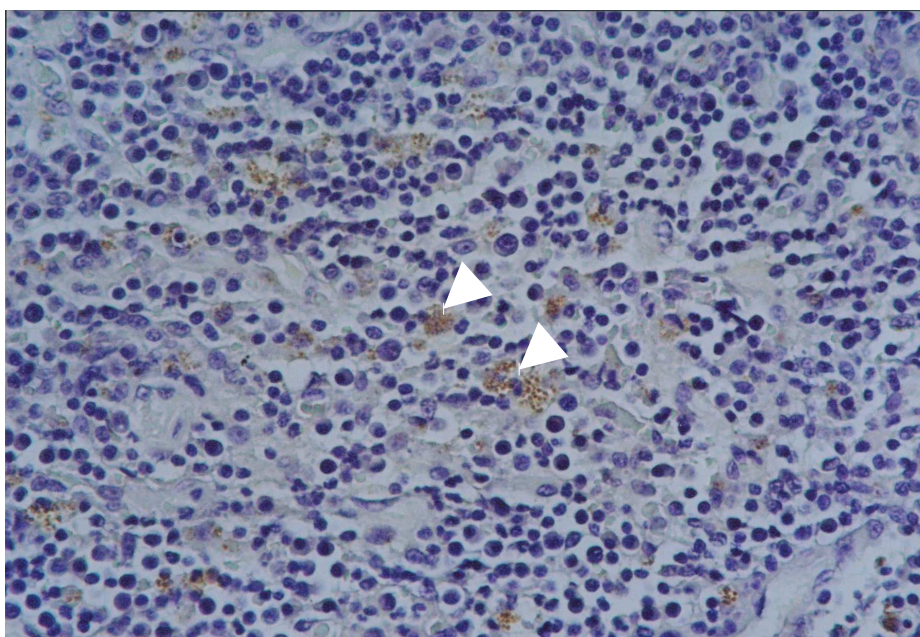


Figura 2 - Linfonodo cervical superficial de animal positivo assintomático; Macrófagos com citoplasma carregado de agregados marrom = Forma amastigota de *Leishmania*

DISCUSSÃO

As manifestações clínicas apresentadas pelos animais do grupo I foram características da LVC e estão de acordo com as descrições de Melo et al. (2008)¹⁴; Rallis et al. (2005)¹⁸; Saridomichelakis et al. (2007)²¹; Moreira et al. (2007)¹⁵ e Ciaramella et al. (1997)⁵.

Os resultados da imunohistoquímica dos linfonodos, conforme constam na Tab.1.

Confrontando os resultados da IHQ obtidos nos linfonodos, no presente trabalho, com a literatura, observa-se que Moreira et al., (2007)¹⁵ registram uma sensibilidade da técnica de 65,85% para o diagnóstico de LVC, em LPs de animais portadores da doença com manifestações clínicas e de 72,73% em cães sorologicamente positivos, mas que não apresentaram sinais da doença, resultados estes inferior aos 85% encontrados em ambos os grupos estudados.

No grupo II, a maior porcentagem de resultados positivos na IHQ dos LCSs (90%) em relação aos LPs (85%) (Tab. 1), corrobora a hipótese de Ciaramella et al., (1997)⁵, de que, em casos de leishmaniose, os linfonodos das regiões craniais do corpo recebem maior carga parasitária, porque estão ligados aos vasos linfáticos que drenam as áreas corporais com grande concentração de lesões da LVC. Os LMs dos animais desse grupo, apesar de se localizarem em área corporal que, em caso de manifestação de sinais clínicos, são amplamente afetadas de lesões, apresentaram 80% de positividade, menor que os 90% observados nos LCSs. Isto pode ser devido à diferença de extensão da área drenada, consideravelmente menor para os LMs, uma vez que os LCSs drenam extensa área de pele e tecido subcutâneo²⁰.

Com relação ao fígado, o baixo número de resultados positivos na prova de IHQ observados no órgão, onde somente 75% dos animais com sinais clínicos e 60% dos sem sinais revelaram positividade (Tab.1), está de acordo com os relatos de Moreira et al. (2007)¹⁵ que, ao compararem a positividade, do fígado no teste de IHQ em cães com LVC, com a da medula óssea e a do LP, observaram que somente 53,66% dos animais com sinais e 56,52% dos sem sinais clínicos, foram positivos. Além disso este órgão tem revelado considerável instabilidade para o diagnóstico de LVC, uma vez que Giunchetti et al., (2008)¹⁰ obteve resultados ainda mais discrepantes, com 25 e 65% de positividade em cães sem manifestações e com sinais clínicos, respectivamente. Estes resultados são consideravelmente menores

que os 75% para o grupo I e os 60% para o grupo II, encontrados no presente estudo.

O mesmo pode ser inferido quando se interpreta os valores observados na IHQ do baço dos cães positivos para LVC testados, onde os 75% de positividade encontrados, tanto nos animais do grupo I, como nos do grupo II (Tab.1), estão próximos aos 60,98% e 69,57%, registrados por Moreira *et al.* (2007)¹⁵ em cães com e sem sinais clínicos de LVC, respectivamente.

Em se tratando da pele, a positividade de 60% na imunohistoquímica da pele dos animais do grupo I, é compatível com o percentual de 70% de resultados positivos encontrados por Soleno-Gallego *et al.*, (2004)²² em amostras de pele de cães infectados com *leishmania infantum*. A comparação da positividade da pele pela imunohistoquímica, entre os 60% do grupo I, com os 15% do grupo II (Tab1) revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,007$) concordando com o resultado encontrado por Giunchetti *et al.*, (2006)¹¹ que demonstraram uma carga parasitária maior na pele de animais com manifestação sinais clínicos, quando comparados com os sem sinais da doença.

Estatisticamente, o tratamento dos resultados da IHQ obtidos nos tecidos dos animais do grupo I não revelou diferença significativa entre órgãos. Quando se aplicou o mesmo tratamento sobre os resultados encontrados nos tecidos dos animais do grupo II, somente a pele foi estatisticamente diferente dos demais órgãos. Entretanto a observação dos dados brutos (Tab 1.), o grupo I, revela que os nodos linfáticos sobressaem em termos de positividade, ocorrendo em 90, 85 e 80% dos LMs, LPs e LCSs, respectivamente. O fígado e o baço evidenciaram resultados semelhantes e a pele foi o órgão que apresentou menor positividade. Estes resultados se repetiram com os animais do grupo II, mas com melhor desempenho do LCS e também pior para a pele (Tab.1).

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que os linfonodos são os órgãos de eleição para o diagnóstico direto da LVC pela IHQ, um teste de eleição para o diagnóstico da doença. A sensibilidade deste teste mostrou considerável aumento de sensibilidade quando aplicado simultaneamente em amostras de, pelo menos três linfonodos diferentes, tendo sido capaz de revelar a presença do parasita em 100% dos animais positivos, sintomáticos e de 95% dos assintomáticos (Tab. 1). Com isso esse procedimento, quando realizado em amostras simultâneas de três

diferentes linfonodos é grande utilidade para dirimir dúvidas quanto à eficiência dos métodos sorológicos de diagnóstico da LVC. Isto poderá contribuir para abreviar eliminação de fonte potencial de infecção humana pela *Leishmania sp*, representada pelos animais portadores assintomáticos de LVC, bem como para prevenir a eutanásia de animais com eventuais resultados sorológicos falso-positivos. Poderá também vir a ser de grande utilidade para avaliar a eficiência de tratamento medicamentoso de caninos positivos, caso este procedimento venha a ser permitido pelas autoridades sanitárias.

REFERÊNCIAS

- 1- Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG: Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol.* 1991;77: 557-61.
- 2- Anderson DC, Buckner RG, Glenn BL, MacVean DW: Endemic canine leishmaniasis. *Vet Pathol.* 1980; 17: 94-6.
- 3 - Brasil, Senado federal. Decreto nº 51.838, de 14 de março de 1963. Normas Técnicas Especiais para o Combate às Leishmanioses.
- 4 - Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP: Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest.* 1997; 9: 439-40.
- 5 - Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A: A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 1997;141: 539-43.
- 6 - De Oliveira AG, Marassa AM, Consales CA, Dorval ME, Fernandes CE, de Oliveira GR, Brazil RP, Galati EA: Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Trop.* 2008;107: 238-41.
- 7 -Desjeux P: Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27: 305-18.
- 8 - El Hag IA, Hashim FA, el Toum IA, Homeida M, el Kalifa M, el Hassan AM: Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *J Clin Pathol.* 1994; 47: 547-51.
- 9 -Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Correa-Oliveira R, Reis AB: Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 121: 23-33.
- 10-Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB: Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2008; 84: 269-77.
- 11-Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB: Relationship between canine visceral

- leishmaniosis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol*. 2006;135: 100-7.
- 12-Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz Tafuri W: Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop*. 2004; 92: 43-53.
 - 13-Maia C, Campino L: Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*. 2008; 158(4): 274-87.
 - 14-Melo F, Amaral M, Oliveira P, Lima W, Andrade M, Michalick M, Raso P, Tafuri W: Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 79:198-204.
 - 15-Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD: Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 2007; 145: 245-52.
 - 16- NSP/VPP- National Security Education Program/Voluntary Protection Program–Leishmaniosis (2002). LEISHMANIOSE EM CAES, disponível em: <http://www.vet.uga.edu/vpp/nsep/Brazil2002/leishmania/Port/Leish02.htm>
 - 17-Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O: Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 65: 510-17.
 - 18-Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A, Koutinas AF: Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol*. 2005; 132: 145-52.
 - 19-Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA: Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* . 2006; 112: 102-16.
 - 20-Saar LI, Getty R. Sistema Linfático do carnívoro. In: Sisson & Grosman Anatomia dos Animais Domésticos. 5ª ed, Guanabara, Rio de Janeiro, 1551-68, 1975.
 - 21-Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Olivry T, Dunston SM, Farmaki R, Koutinas CK, Petanides T: Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*. 2007; 18: 227-23.
 - 22-Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L: Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol*. 2004; 130: 7-12.
 - 23-Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN: Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*. 2001; 96: 203-12.
 - 24-Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS: An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*. 2004; 292: 17-23.
 - 25-Behmer OP, Talosa EMC, Freitas AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART; 1976.