

WANDERSON GERALDO DE LIMA

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ESTUDO QUANTITATIVO E
COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO COMPLEMENTO DO
TIPO 3 (CR3 – CD11b/CD18) COM ALGUNS ASPECTOS HISTOLÓGICOS E
PARASITOLÓGICOS DO BAÇO, FÍGADO E LINFONODOS DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) chagasi*

BELO HORIZONTE

FEVEREIRO DE 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDICINA LEGAL

LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ESTUDO QUANTITATIVO E
COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO COMPLEMENTO DO
TIPO 3 (CR3 – CD11b/CD18) COM ALGUNS ASPECTOS HISTOLÓGICOS E
PARASITOLÓGICOS DO BAÇO, FÍGADO E LINFONODOS DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) chagasi*

BELO HORIZONTE, FEVEREIRO DE 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDICINA LEGAL

TESE DE DOUTORADO

BELO HORIZONTE
FEVEREIRO DE 2007

WANDERSON GERALDO DE LIMA

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor em Patologia Geral.

Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina – UFMG

2007

As lágrimas que não se choram
esperam em pequenos lagos?
Ou são rios invisíveis
que escorrem até a triteza?

Pablo Neruda

Ao grande amigo Emeson,
que se foi, e a muitos, deixou saudade
e a alegria de uma convivência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri (Boss)
Modelo de Orientador, pessoa e amigo.
Obrigado pelos ensinamentos em todos
os anos de convivência.

AGRADECIMENTOS

A Deus e meus familiares, minha mãe Marli e meus irmão Claudio e Eduardo, aos amigos Patricia da Silva Oliveira, Ricardo Gonçalves, Vanessa Martins Ferreira, Trycia Martins, Elaine Perlatto-Moura, Ferdinan Melo, Felipe Arruda Cosenza, Maria Marta Figueiredo, Maria Noviello, Maria Letícia Costa Reis, Ana Paula Nadu, Fabio Augusto Rodrigues e Silva, Terezinha Marques, Luciana dos Reis Gomes, Fabiana Lessa Silva, Luciene Simões Tafuri, Mariana Amato, Silvio Coura Xavier, Esdras Alexander Coelho, Miriam Maria Costa, Marina Elizabeth Amaral, Fernanda Nobre, Héliida Monteiro de Andrade, aos técnicos e funcionários do Departamento de Patologia Geral - ICB/UFMG, aos professores dos Departamentos de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG e Patologia Geral do ICB/UFMG, a UFMG e as agencias de fomento CNPq e FAPEMIG e a todos os outros que direta ou indiretamente contribuíram a jornada desse trabalho.

Obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

CD – *Clauster Differentiation*

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

H&E – Hematoxilina e Eosina

LC – Leishmaniose Cutânea

LDU – *Leishman Donovan Unit*

LPG – Lipofosfogliganos

LV – Leishmniiose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LVH – Leishmaniose Visceral Humana

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal

OMS – Organização Mundial de Saúde

SC – Sistema de Complemento

SMM – Sistema Monocítico Mononuclear

INDICE

1.0 – INTRODUÇÃO	17
1.1 – Aspectos gerais das leishmanioses	17
1.2 – A leishmaniose visceral	17
1.3 – A leishmaniose visceral canina	18
1.4 – Manifestações clínicas e patológicas na LVC	20
1.5 – A interação <i>Leishmania</i> e seus hospedeiros	21
1.5.1 – Interações no hospedeiro invertebrado	21
1.5.2 – Interações no hospedeiro vertebrado	22
1.5.2.1 – Promastigotas de <i>Leishmania</i> / macrófagos	22
1.5.2.2 – Amastigotas de <i>Leishmania</i> / macrófagos	24
2.0 – OBJETIVOS	26
2.1 – Objetivo geral	26
2.2 – Objetivos específicos	26
3.0 – MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 – Animais	27
3.2 – Aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal	27
3.3 – Necropsia	29
3.4 – Índice de LDU (<i>Leishmana Donovan Units</i>)	29
3.5 – Microscopia óptica	29
3.6 – Técnica de Imuno-histoquímica	31
3.6.1 – Soluções e anticorpos empregados na técnica	31
3.6.2 – Reações imuno-histoquímicas: Método da estrepto-avidina peroxidase	32
3.7 – Análises morfométricas	33
3.7.1 – Quantificação do parasitismo tecidual	35
3.7.2 – Quantificação para o número de células positivas para a integrina CR3 (CD11b e CD18)	35

3.7.3 – Quantificação da expressão densitométrica das proteínas CR3	35
3.7 – Análises estatísticas	37
4.0 – RESULTADOS	38
4.1 – Avaliação clínica	38
4.2 – Índice da LDU do baço	38
4.2.1 – LDU do baço	38
4.2.2 – LDU dos linfonodos	39
4.3 – Parasitismo tecidual pela técnica da imuno-histoquímica	40
4.3.1 – Parasitismo tecidual no baço	40
4.3.2 – Parasitismo tecidual no fígado	40
4.3.3 – Parasitismo tecidual nos linfonodos	41
4.3.4 – Parasitismo tecidual na pele	42
4.4 – Avaliações anátomo-patológicas	43
4.4.1 – Avaliações macroscópicas	43
4.4.2 – Avaliações histológicas do baço	43
4.4.3 – Avaliações histológicas do fígado	45
4.4.4 – Avaliações histológicas dos linfonodos	48
4.4.5 – Avaliações histológicas da pele	51
4.5 – Avaliação da expressão celular de CR3 (CD11b/CD18)	52
4.5.1 – Expressão de CR3 (CD11b/CD18) no baço	52
4.5.2 – Expressão de CR3 (CD11b/CD18) no fígado	53
4.5.3 – Expressão de CR3 (CD11b/CD18) nos linfonodos	54
4.6 – Análises densitométricas da expressão de CR3 (CD11b/CD18)	57
4.6.1 – Análises densitométricas no baço	57
4.6.2 – Análises densitométricas nos linfonodos	57
4.7 – Análises de correlação	59
5.0 – DISCUSSÃO	61
6.0 – CONCLUSÕES	69
7.0 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	77

LISTA DE GRÁFICOS

Grafico 01	38
Grafico 02	39
Grafico 03	39
Grafico 04	40
Grafico 05	41
Grafico 06	42
Grafico 07	42
Grafico 08	53
Grafico 09	53
Grafico 10	55
Grafico 11	55
Grafico 12	57
Grafico 13	58
Grafico 14	58
Grafico 15	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	45
Tabela 02	46
Tabela 03	47
Tabela 04	48
Tabela 05	49
Tabela 06	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	28
Figura 02	34
Figura 03	36
Figura 04	44
Figura 05	47
Figura 06	50
Figura 07	56

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar alguns aspectos clínicos, histopatológicos, parasitológicos e imunológicos, de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. O enfoque principal foi o de comparar a expressão do receptor do complemento do tipo 3 (CR3 - CD11b/CD18) no baço, fígado, linfonodos (axilares, cervicais e poplíteos) com alguns aspectos clínicos, histológicos e parasitológicos. Para isso, foram utilizados dez animais não infectados (grupo controle) e trinta animais infectados. Todos eram provenientes da região do Município de Sabará/MG sem raça e idade definidos. Os animais infectados foram subdivididos em dois grupos: grupo denominado assintomático composto por dez animais que não apresentavam sinais clínicos da doença; (2) grupo denominado sintomático: composto por vinte animais que apresentavam sinais clínicos clássicos da doença como lesões de pele (alopecia, eczemas, seborréia, ulcerações), perda de peso e linfadenopatias. Em necropsia, fragmentos de baço, fígado, linfonodos (axilares, cervicais e poplíteos) e pele (orelha, espelho nasal e abdômen) foram coletados, fixados em solução de formol a 10% tamponado e em seguida processados pelas técnicas rotineiras de histopatologia. Cortes parafinados dos diversos tecidos foram montados em lâminas histológicas e corados pela Hematoxilina e Eosina (H&E), e pela técnica Imuno-histoquímica da estrepto-avidina-peroxidase para análises microscópica e parasitológica, respectivamente. Cortes criopreservados dos mesmos tecidos, com a exceção da pele, foram corados pela técnica imuno-histoquímica da estrepto-avidina-peroxidase para marcação tecidual das proteínas CD11b e CD18 (CR3). A expressão tecidual e celular de CR3 (CD11b/CD18) foi acessada por técnicas de morfometria digital (avaliação do número e técnicas de densitométrica óptica). Nossos resultados revelaram uma expressão densitométrica e celular do CR3 aumentada em animais infectados quando comparada a animais controle, mas não diferente entre os animais assintomáticos e sintomáticos. Correlações positivas foram encontradas entre a presença do parasitismo tecidual e a expressão das proteínas CD11b e CD18 no baço e linfonodo cervical e negativa para e o parasitismo hepático. De fato, animais sintomáticos apresentaram uma maior expressão de CR3 no baço e nos linfonodos cervicais, associada também a um maior parasitismo tecidual. Por outro lado, no fígado ocorreu uma maior expressão tecidual de CR3 em animais assintomáticos do que os sintomáticos. Entretanto, isto foi associado a um menor parasitismo nesses animais. Podemos dizer, então que a resposta imune parece ser órgão-específica (compartimentalização da resposta imune), em que as células inflamatórias exercem um papel imune distinto em diferentes órgãos. Às vezes, podem atuar como fonte de perpetuação da infecção, ou às vezes, como células efectoras capazes de controlar a infecção por *Leishmania*. Seguindo nossos resultados, em que os animais sintomáticos apresentam maior expressão de CR3 e maior taxa de parasitismo no baço e linfonodos, podemos permitir atribuir a essas células (monócitos-macrófagos) papel na manutenção da infecção.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate some clinical, histopathological, parasitological and immunological aspects of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. The principal aim was to compare the third receptor of complement CR3 (CD11b/CD18) in spleen, liver, lymph nodes (axillar, cervical and popliteal) with clinical, histological and parasitological findings. This study was carried out with ten control dogs (uninfected animals) and thirty infected dogs. All them was mongrel dogs with undefined age and was obtained from the municipality of Belo Horizonte, metropolitan area. The infected animals were divided in two groups: (1) group denominated asymptomatic composed by ten animals without clinical signs of the disease; (2) group denominated symptomatic composed by twenty animals with classical clinical signs of the disease as skin lesions (alopecia, eczema and ulcers), loss weight and lymphopathy. During necropsy, fragments of spleen, liver, lymph nodes (axillary, cervical, and popliteal) and skin (ears, nose and abdomen) were collected and fixed with formaldehyde solution 10% for histological analysis. Paraffined sections of all tissues were mounted on histological slides and stained by Hematoxylin-Eosin (H&E) and the strepto-avidin peroxidase immunohistochemical method for microscopical and parasitological analysis, respectively. Frozen tissue sections of all organs, except skin samples, were stained by the strepto-avidin peroxidase immunohistochemical method for CR3 (CD11b/Cd18) tissue characterization. The tissue and cellular CR3 expression was evaluated by morphometrical digital analysis. Densitometrical CR3 expression was higher in infected animals than controls, but it was not different when compared between animals with different defined clinical status. CR3 cell expression in spleens was higher in symptomatic animals than in asymptomatic ones where the parasite load was higher. In another side, CR3 cell expression in livers was higher in asymptomatic animals than in symptomatic ones, where the tissue parasite load was lower. However, there was a positive correlation between the parasite load and cellular CR3 expression in the spleens and cervical lymph nodes of infected dogs and there is a negative correlation in liver. We can say, that the immune response appears to be organ specific (immune response compartmentalization) whereas inflammatory cells play a distinct role. Sometimes, they could act to perpetuate the infection or they could act as effector cells in order to control the infection. Following our results where the symptomatic animals showed higher parasite loads and higher CD11b/CD18 expression in their lymphoid organs as spleen and lymph nodes, we can conclude that these cells (monocyte-macrophages) might serve to perpetuate intracellular infection.

1.0 – INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos gerais das leishmanioses

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários digenéticos, do gênero *Leishmania*, ordem *Kinetoplastida* (Ross, 1906), apresentando várias formas morfológicas distintas. Agrupam-se no gênero cerca de 30 espécies, sendo aceito que, aproximadamente 21 tenham a capacidade de produzir alterações patológicas na espécie humana (Herwaldt, 1999; Ashford, 2000). As leishmanioses incluem várias doenças que são determinadas pela espécie do parasito e das interações entre esses parasitos e seus hospedeiros. No homem a doença manifesta-se em formas clássicas descritas como a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose cutâneo mucosa, a leishmaniose cutânea disseminada, a leishmaniose cutânea difusa, a leishmaniose dérmica pós-calazar e a leishmaniose visceral (Ashford, 2000).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1990 existiam 12 milhões de pessoas apresentavam algum tipo de leishmanioses no mundo e com expectativa de surgimento de 500 mil novos casos a cada ano, sendo que 90% desses casos ocorrem em países como o Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (Desjeux, 2004).

1.2 – A leishmaniose visceral (LV)

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose na Índia e uma zoonose na Europa e América do Sul, de caráter endêmico para o homem e com ampla distribuição geográfica em países de clima tropical ou subtropical, perdendo em incidência apenas para a malária. A doença tem como agente etiológico as espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* (Índia) e *Leishmania (Leishmania) infantum* (Europa e Bacia do Mediterrâneo incluindo Norte da África) causadoras da enfermidade no chamado “Velho Mundo”, e a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* (*syn. L. infantum*) no “Novo Mundo” (Maurício *et al.*, 2000).

Nas Américas a LV ocorre em aproximadamente 24 países, tendo um caráter zoonótico, sendo o homem considerado um hospedeiro acidental no ciclo de vida das várias espécies do parasito, que inclui ainda como hospedeiro invertebrado, fêmeas dos insetos flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* e como hospedeiros vertebrados canídeos, marsupiais e roedores dentre outros (Grimaldi & Tesh, 1993).

A transmissão ocorre para o homem e para os animais durante o repasto sangüíneo, realizado por flebotomíneos fêmeas. A infecção inicia-se quando o inseto regurgita formas promastigotas do parasito em seu estágio metacíclico (Sacks, 1989; Schlein, 1993), dentro das chamadas “piscinas de sangue” na derme dos hospedeiros vertebrados, formadas pela ação de sucção do inseto. Após inoculação, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos da pele, onde se modificam para formas aflagelados e ovóides conhecidas como amastigotas. Nos mamíferos as formas amastigotas residem e multiplicam-se principalmente dentro dos endossomos das células constituintes do SMM. (Chang, 1979; Russel & Talamas-Rohana, 1989; Mosser & Rosenthal, 1993). Dentro das células do SMM as formas amastigotas multiplicam-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma. Em alguns casos o núcleo dessas células chega a deslocar-se lateralmente para dar lugar ao vacúolo com as formas amastigotas (Russell, 1989). O processo ininterrupto de divisão das amastigotas determina o abarrotamento de parasitas dentro dos macrófagos, até que esses sejam lisados, com liberação das amastigotas que infectarão novas células.

Podem ocorrer pequenas variações nesse processo de acordo com as diferentes espécies de *Leishmania* e as características genéticas dos hospedeiros e das interações imunológicas desencadeadas pelo parasitismo (Chang, 1979; Mosser & Rosenthal, 1993; Mosser & Brittingham, 1997). Ao realizar o repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, os insetos ingerem formas amastigotas de *Leishmania* presentes no sangue. No tubo digestório dos insetos, as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas. As formas promastigotas por sua vez, sofrem várias transformações, com migração para porções anteriores desse trato digestório (formas metacíclicas infectantes). A fêmea ao fazer um novo repasto sangüíneo no hospedeiro vertebrado inocula as formas promastigotas fechando-se o ciclo (Chang, 1979; Schlein, 1993).

1.3 – A leishmaniose visceral canina (LVC)

O cão tem um papel importante dentro da epidemiologia da doença, já que este tem sido considerado como o principal reservatório doméstico para a doença humana na natureza (Chagas *et al.*, 1938; Deane, 1956; Alencar, 1959; Deane & Deane, 1962; Ashford *et al.*, 1998; Alvar *et al.*, 2004). Ashford *et al.*, (1998) apontam como reservatório de uma doença infecciosa, a espécie na qual o agente causador sobrevive, e assim, mantendo-se no ambiente. Além disso, Saliba & Oumeish (1999) afirmaram que essa espécie deve ser abundante no seu sistema e viver tempo suficiente que permita ciclos de transmissão da doença. É amplamente aceito que a

manutenção da LV em uma comunidade, bem como a dificuldade da erradicação da doença em meios antrópicos está associada a pouca capacidade de se determinar de maneira completa todos os casos da doença não humana e a capacidade dos animais de infectar os vetores. Acredita-se que em meios rurais os marsupiais e canídeos silvestres, tais como gambás e raposas sejam os reservatórios silvestres e em meios urbanos, os cães são determinados como os reservatórios domésticos (Saliba & Oumeish, 1999; Reithinger & Davies, 2002).

Estudos pioneiros realizados por Chagas *et al.*, (1938), na região Norte do Brasil, evidenciaram a existência de cães naturalmente parasitados, em paralelo com a infecção humana. Todavia, a LVC no Brasil só teve relevância quando foi estudada em uma área de grande endemicidade: o nordeste brasileiro. No Ceará, Deane & Deane (1955), em estudo comparativo entre a infecção humana e canina, encontrou parasitos na pele de 16,3% dos indivíduos e em 77,6% dos cães naturalmente infectados. Além disso, verificou-se que a infecção experimental de flebotomíneos era mais freqüente e intensa quando os insetos se alimentavam em cães (75%) do que em pacientes humanos (28,5%). Essas observações, bem como outros trabalhos relacionados com a doença canina em áreas endêmicas de leishmaniose visceral humana (Deane & Deane, 1962; Iversson *et al.*, 1983; Marzochi, *et al.*, 1985), mostram o cão como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos, quer seja pela alta prevalência da infecção canina nas regiões estudadas, quer seja pela presença do parasito na pele, o que favorece a infecção do inseto vetor e, conseqüentemente, a transmissão ao homem.

Atualmente no Brasil, a LVC está em expansão e urbanização, assim como outras doenças parasitárias. Como determinantes epidemiológicos desse processo pode-se apontar a movimentação de pessoas e animais domésticos de áreas endêmicas para áreas onde o inseto transmissor já se encontrava adaptado e o desmatamento desordenado com conseqüente desequilíbrio dos ecossistemas. Portanto, a transmissão da doença canina tem ocorrido de formas peri-urbana e urbana muito próxima ao centro de grandes cidades brasileiras como, Teresina, Fortaleza, Aracaju, João Pessoa, Rio de Janeiro, Corumbá, Santarém e Belo Horizonte (Michalick *et al.*, 1993; Marzochi, 1994; Ashford 1998; Tesh, 1995).

1.4 – Manifestações clínicas e patológicas na LVC

No cão na LV apresenta formas clínicas assintomáticas e sintomáticas sendo que o período de incubação é incerto, podendo variar de três meses até vários anos (Genaro, 1993). Observam-se um variado espectro de lesões e alterações patológicas, sendo esse derivado das complexas interações da relação do parasito com seu hospedeiro.

Os sinais clínicos mais comum naLVC são a febre, descamação e eczema, principalmente no espelho nasal e orelha, pêlo opaco e ulcerações leves localizadas freqüentemente nas orelhas, espelho nasal, cauda e articulações, úlcera de decúbito. Com grande freqüência observa-se, nas fases mais adiantadas da doença, esplenomegalia, alopecia generalizada, ulcerações mais acentuadas na pele, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarréia, melena ou hematoquesia, edema das patas, vômito, além do aparecimento de áreas de hiperqueratose especialmente na ponta do espelho nasal. Na fase final da infecção ocorrem em geral paraparesia, caquexia, inanição e óbito do animal (Abranches *et al.*, 1991; Brener,1957; Deane & Deane, 1955; Dias *et al.*, 1999; Genaro, 1993; Lanotte *et al.*, 1979; Marzochi *et al.*, 1983; Slappendel & Greene, 1990).

Na LVC lesões histopatológicas são principalmente associadas a hipertrofias e hiperplasias observadas nas células do SMM. São descritas lesões acometendo órgãos como fígado, baço, linfonodos, pulmões, medula óssea, rins, intestinos e tegumento e vasos (Bogliolo, 1956; Alencar, 1959; Genaro, 1993; Tafuri *et al.*, 1996; Tafuri *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002, Lima *et al.*, 2004).

No fígado observa-se infiltrado mononuclear (plasmo-histio-linfocitário) nos espaços-porta e no interior de lóbulos (granulomas intralobulares) e hiperplasia das células de Küpffer. (Chung *et al.*, 1940; Brener, 1957; Keenan *et al.*, 1984; Genaro,1993; Tafuri *et al.*, 1996; Tafuri *et al.*, 2001). O baço pode apresentar tamanho normal, discretamente aumentado ou hipertrofiado (Donatien e Lestoquard, 1935; Chung *et al.*, 1940; Alencar, 1959). Nesse órgão ocorre diminuição das células da bainha periarteriolar (depleção das áreas T dependentes) com proliferação de macrófagos parasitados. Hiperplasia da polpa vermelha devido a proliferação de macrófagos, às vezes formando agregados ou nódulos celulares intensamente parasitados. (Keenan *et al.*, 1984; Genaro, 1993; Tafuri *et al.*,1996). Nos linfonodos, o aumento de número e tamanho dos folículos linfóides e a hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos medulares (cordões e seios), explicam a linfadenomegalia observada clinicamente (Lima *et al.*,

2004). A presença de grande número de plasmócitos (plasmocitose) também é achado freqüente, bem como no baço (Tafuri 1995).

Nos pulmões observa-se a ocorrência de pneumonite intersticial crônica com espaçamento dos septos inter-alveolares (Tryphonas *et al.*, 1977; Duarte *et al.*, 1986; Gonçalves, 2003). A medula óssea pode-se encontrar hiperplásica podendo ou não conter parasitos (Keenan *et al.*, 1984). No rim a glomerulonefrite causada pela deposição de imunocomplexos (Tafuri *et al.*, 1989) é freqüente e os sinais clínicos apenas se tornam evidentes quando a lesão renal já é grave. Em alguns casos a insuficiência renal é o único sintoma observado e nestes casos o óbito pode ocorrer em poucos dias (Ciaramella *et al.*, 1997). No intestino a hiperplasia linfóide das placas de Payer, associada ou não ao parasitismo, pode ocorrer nos intestinos delgado, jejuno e íleo, grosso, ceco e cólon (Brenner, 1957; Keenan *et al.*, 1984; Tafuri 1995). Silva (2001) demonstrou maior parasitismo nas porções finais do intestino grosso (ceco e colon).

1.5 – A interação *Leishmania* e seus hospedeiros

O sucesso do desenvolvimento e progressão da LV está diretamente associado às interações entre o parasita e seus hospedeiros invertebrados e vertebrados. As interações das várias formas de *Leishmania* envolvem mecanismos complexos. Fatores de excreção sintetizados pelo protozoário determinam o sucesso da infecção no hospedeiro invertebrado apropriado (Schlein, 1993), além disso, são também sintetizados pelos parasitos fatores capazes de naturalizar sistemas de defesa e sua internalização nas células dos hospedeiros vertebrados (Russel & Talamas-Rohana, 1989).

1.5.1 – Interações no hospedeiro invertebrado

Para infectar o hospedeiro, *Leishmania* deve ser capaz de sobreviver dentro do trato digestório do flebotômíneo. As formas promastigotas possuem uma camada de moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, consistindo de um núcleo glicana, uma âncora lipídica altamente conservada e unidades variáveis de oligossacárides. Essas formas expressam grandes quantidades de LPG, bem como de outros glicoconjugados, como a metaloprotease - gp63, ambos capazes de proteger o parasita da ação das enzimas hidrolíticas presentes no intestino do flebotômíneo (Alexander *et al.*, 1999). Interações envolvendo LPG com lectinas e moléculas tipo lectinas presentes no intestino do inseto, impedem que as formas promastigotas

procíclicas sejam eliminadas juntamente com o bolo alimentar. Durante a metaciclogênese, estas formas sofrem uma extensa modificação estrutural, envolvendo o tamanho e a expressão de açúcares de LPG, transformando-se em promastigotas metacíclicas (Chang, 1979). Estas apresentam reduzida afinidade de ligação as lectinas, levando ao desligamento do epitélio intestinal e migração para a probóscida do inseto, com posterior transmissão para o hospedeiro vertebrado (Cunningham, 2002).

1.5.2 – Interações no hospedeiro vertebrado

1.5.2.1 – Promastigotas de *Leishmania*/ macrófagos

Células do Sistema Monocítico Mononuclear (SMM), principalmente macrófagos, são os principais “alvos” dos protozoários do gênero *Leishmania*. Órgãos ricos desses tipos celulares (fígado, baço, medula-óssea, pele e linfonodos) são principalmente atingidos.

As interações de formas promastigotas de *Leishmania* com fagócitos mononucleares tem sido bem caracterizadas, e a participação de vários receptores desempenha um papel fundamental na adesão e internalização das promastigotas pelos macrófagos (Blackwell *et al.*, 1985; Mosser & Rosenthal, 1993; Kane & Mosser, 2000). Esta interação se dá com a participação de moléculas da superfície do parasito (lipofosfoglicanos e gp63) ou opsoninas derivadas do hospedeiro (complemento, fibronectina ou imunoglobulinas) e múltiplos receptores nos macrófagos (receptores para o complemento - CR, receptores para fibronectina, receptor de fucose-manose e receptores para Fc de IgG).

As imunoglobulinas circulantes IgG anti-*Leishmania*, específicas, se ligam às formas promastigotas metacíclicas, aumentando a adesão das mesmas aos macrófagos, por meio dos receptores para a porção Fc das IgG Fc γ R (Mosser & Rosenthal, 1993). Estudos *in vitro* evidenciaram a capacidade de formas amastigotas e promastigotas (*L. amazonensis*) de se ligarem à proteína fibronectina facilitando assim a aderência e a internalização em macrófagos (Wyler *et al.*, 1985).

O sistema de complemento, juntamente aos anticorpos, é o principal mediador humoral dos processos inflamatórios. É constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma, como expressas nas membranas de certos tipos celulares (Iturry-Yamamoto & Portinho, 2001). Para que o sistema de complemento exerça suas

funções biológicas este deve ser ativado, originando uma série de fatores sorológicos oriundos da quebra de suas proteínas componentes (Sim *et al.*, 1987; Ember & Hugli, 1997). Os fatores sorológicos do complemento, especialmente C3 e seus produtos de clivagem, C3b, C3bi e C3dg, facilitam o processo da fagocitose por opsonização, pois os macrófagos possuem receptores específicos (receptores do complemento - CR) para os três fragmentos (Ross & Medof, 1985; Lambris, 1988).

Sabe-se que parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de ativar o complemento, tanto pela via clássica como pela via alternativa (Pearson & Steigbigel, 1980; Mosser & Edelson, 1985; Puentes *et al.*, 1989). Entretanto, as moléculas de LPG presentes na superfície das promastigotas metacíclicas impedem a inserção de complexo lítico C5-9 na superfície do parasito, caracterizando um dos mecanismos de escape de *Leishmania* (Hall & Joiner, 1991).

Os ligantes dos macrófagos para os fatores sorológicos IgG, fibronectina e complemento, comentados anteriormente, são os receptores para a porção Fc das imunoglobulinas G (Fc γ R), as integrinas (glicoproteínas transmembranas) da família β 1 e β 2 e os receptores para complemento do tipo 1 (CR1), do tipo 2 (CR2), do tipo 3 (CR3) e do tipo 4 (CR4), respectivamente (Mosser, 1993). Sua importância na adesão promastigota-macrófago depende da espécie de *Leishmania* envolvida. De acordo com Mosser & Rosenthal (1993), para a interação de promastigotas de *L. major* e *L. enrietti*, são necessários componentes do complemento, enquanto *L. amazonensis* adere eficientemente a macrófagos de camundongo na ausência do soro. O mesmo pode ser observado em relação a *L. donovani* e macrófagos humanos, sendo que os receptores macrofágicos para manose participam no processo da adesão (Jenefer *et al.*, 1985 ; Wilson & Pearson, 1986).

Os receptores específicos para complemento (CR1, CR3 e CR4) têm sido incriminados em exercer um papel crucial na interação com promastigotas opsonizadas, tanto com macrófagos humanos quanto com macrófagos de camundongos (Mosser & Edelson, 1985; Mosser *et al.*, 1992; Rosenthal *et al.*, 1996; Handman & Bullen, 2002). Assim, o sistema mais bem caracterizado já descrito é o que ocorre entre promastigotas opsonizadas pelo complemento e receptores para o complemento nos macrófagos (Mosser & Edelson, 1985). Além disso, a opsonização dos parasitos, dependente de complemento, não só melhora sua adesão aos

macrófagos, como também aumenta sua sobrevivência intracelular (Mosser & Edelson, 1987; Gonçalves, 2003).

1.5.2.2 – *Amastigotas de Leishmania/ macrófagos*

Acredita-se que a interação amastigota macrófago também aconteça de maneira direta, entretanto, essa interação na ausência de opsonização, permanece ainda não totalmente esclarecida (Kane & Mosser, 2000).

De forma opsonizada, como já dito, os ligantes do parasito envolvidos compreendem os LPG, a glicoproteína majoritária gp63 (protease de superfície), e alguns carboidratos. Os contra-receptores macrofágicos relacionados são os receptores CR3 e CR4 para as LPG (Talamas-Rohana *et al.*, 1990), os receptores CR3 para a gp63 (Russel & Wright, 1988) e os receptores para manose e fucose reconhecedores desses carboidratos (Mosser & Rosenthal, 1993). Guy & Belosevic (1993), em modelos murinos na leishmaniose causada por *L. major* apontam a participação de receptores para porção Fc das imunoglobulinas nessa interação, demonstrando maior ligação de formas amastigotas a células fagocitárias hospedeiras em soros com altas concentrações de IgG anti-*Leishmania*. Em estudos “*in vitro*” Blackwell *et al.* (1985) ao bloquear o receptor para o complemento do tipo 3 (CR3), também observaram menor quantidade de *Leishmania*-macrófago aderidas, sugerindo também, a importância deste receptor na adesão.

Recentemente, Lima *et al.* (2007), apontaram o receptor do complemento do tipo 3 como importantes proteínas associadas a resposta imune contra leishmaniose visceral canina no modelo naturalmente infectado com *Leishmania chagasi*. Para os autores, a maior expressão de CR3 no baço desses animais se associaria ao maior parasitismo nesse órgão, indicando um possível papel mantenedor de células CR3 positivas do parasitismo tecidual. Ao contrário, no fígado, células positivas para a expressão de CR3 estariam associadas a menor parasitismo tecidual sugerindo a essas células, nesse órgão um papel protetor na resposta imune da leishmaniose visceral canina.

Baseando-se na patogênese da doença canina, na amplitude clínica observada em animais naturalmente infectados e acreditando na importância da interação entre o parasito e suas células hospedeiras para a formação das alterações histopatológicas bem como na importância dos receptores do complemento nessa interação, esse trabalho apresenta como foco o estudo qualitativo e quantitativo da expressão do

receptor do tipo 3 (CR3 – CD11b/CD18) nos órgãos linfóides (baço, linfonodos e tegumento) e fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.

2.0 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

- Avaliar aspectos clínicos, parasitológicos, histopatológicos, correlacionando a expressão qualitativa e quantitativa do receptor do complemento do tipo 3 (CR3 – CD11b/CD18) no baço, fígado, linfonodos e pele de animais naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.

2.2 – Objetivos específicos

- Realizar avaliações clínicas e sorológicas de todos os animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*;
- Realizar análises histopatológicas do baço, fígado, linfonodos axilares, cervicais e poplíteos e peles do abdome, do focinho e da orelha;
- Avaliar quantitativamente o parasitismo tecidual por formas amastigotas de *Leishmania* nos órgãos, através das técnicas do índice da LDU e imuno-histoquímica;
- Avaliar qualitativamente a expressão do receptor do complemento do tipo 3 (CR3) pelas técnicas histologia e de imuno-histoquímica.
- Quantificar a expressão do receptor do complemento do tipo 3 (CR3) por técnicas de imuno-densitometria digital.

3.0 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Em todos os experimentos foram utilizados quarenta cães sem raça ou idade definidas, obtidos junto ao Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Sabará-MG (Brasil). Todos esses animais foram submetidos aos testes diagnósticos sorológicos para leishmaniose como a imunofluorescência indireta (RIFI), o teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), o teste da reação de fixação de complemento (RFC) no Laboratório de Sorologia do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, além do esfregaço de medula óssea para diagnóstico parasitológico.

Os cães receberam tratamento anti-helmíntico e contra ectoparasitos, sendo mantidos em quarentena com água e comida “*ad libidum*”.

Os animais foram subdivididos em três grupos:

- Grupo 1 – Animais controle – dez cães com diagnóstico sorológico e parasitológico negativo para leishmaniose;
- Grupo 2 – Animais assintomáticos – dez cães positivos nos testes diagnósticos e sem qualquer sinal ou sintoma clínico da leishmaniose (Figuras 1a,b);
- Grupo 3 – Animais sintomáticos – vinte cães positivos nos testes diagnósticos e que apresentavam sinais e sintomas característicos da doença como: alterações cutâneas (alopecia, eczemas ou úlceras); onicogribose; ceratoconjuntivite, linfadenomegalia, caquexia, etc (Figuras 1c,d).

3.2 – Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

Esse estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, registrado no protocolo 035/04 do Comitê (Anexo I).



Figura 1: Animais naturalmente infectados sorologicamente positivos para leishmaniose: (A;B) Cães assintomáticos: sem presença de sinais ou sintomas clássicos da doenças. (C;D) Cães sintomáticos: apresentando clinicamente sinais e sintomas associados a doença como magreza, ulcerações de pele e onicogrifose.

3.3 – Necropsia

Em necropsia, depois de realizada a avaliação clínica, todos os animais foram primeiramente anestesiados com Thiopental Sódico® na concentração de 2,3%, dose de 1ml/Kg. i.v. e, após isso, sacrificados com o curarizante T-61®, dose de 0,3 ml/Kg, i.v. Fragmentos de baço, fígado linfonodos (axilares, cervicais e poplíteos) e de pele (orelha, espelho nasal e abdomen) dentre outros foram coletados e fixados para exames histológicos e imuno-histoquímicos. Outros fragmentos desses órgãos foram retirados e acondicionados em solução salina resfriada, com posterior congelamento em criopreservador *Tissue Tek*® para confecção de lâminas em criostato.

3.4 – Unidade de Leishman Donovan – LDU

Na necropsia fragmentos do baço e dos linfonodos coletadas foram impressos em lâminas limpas e desengorduradas por método de esfregaços por aposição (“imprints”).

As lâminas foram fixadas em solução de álcool metílico por 5 minutos e após secagem em temperatura ambiente coradas por solução de GIENSA a 10% (diluição em água destilada).

Foi determinado em cada lâmina, através da contagem microscópica de luz (em objetiva de imersão), o número de amastigotas considerando-se um mil núcleos de células mononucleadas. O cálculo da LDU consistiu na razão do número de amastigotas pelo número de células contadas, multiplicando-se pelo peso do órgão em questão na fórmula a seguir (Stauber, 1956):

$$\text{LDU} = \frac{\text{Número de formas amastigotas contadas}}{\text{Número de células mononucleares (acima de 1000)}}$$

3.5 – Microscopia óptica:

Em necropsia, fragmentos de órgãos como baço, fígado, linfonodos e pele foram fixados em solução de formol tamponado a 10%, pH 7,2. O material foi então processado em equipamento histotécnico automático seguindo-se desidratação, diafanização, e inclusão em parafina. Após este procedimento, blocos de parafina, contendo os fragmentos dos órgãos, foram cortados em micrótomo na espessura de 4-

5µm de e montados em lâminas previamente desengorduradas com solução álcool-éter, e banhadas em solução gelatinosa de fixação.

Em cada lâmina foram colocados dois cortes. Posteriormente, os cortes histológicos foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H&E) e observados em microscopia óptica para avaliação histológica.

A análise histopatológica dos órgãos foi realizada em tecidos de 40 animais, divididos em: dez controles, dez assintomáticos e vinte sintomáticos. Observaram-se os seguintes parâmetros:

1) Baço: avaliação morfológica com especial atenção aos macrófagos da polpa vermelha e zona marginal, estudo da presença de granulomas, avaliação da reatividade da polpa branca, espaçamento e inflamação capsular (Tafari et al., 1996). As lesões avaliadas foram classificadas de forma semi-quantitativa considerando-se a área ocupada pelas células inflamatórias nos fragmentos teciduais. Assim, áreas menores que 1/3 dos campos avaliados foram consideradas discretas (+), entre 1/3 e 2/3 consideradas moderadas (++) e acima de 2/3 consideradas intensas (+++).

2) Fígado: avaliação morfológica dos fenômenos degenerativos, inflamação da cápsula, inflamação portal, congestão sinusoidal, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer e presença de granulomas intralobulares (Silva, 2004). O parâmetro semi-quantitativo da avaliação tecidual seguiu o adotado para baço como descrito anteriormente.

3) Linfonodos axilares, cervicais e poplíteos: linfadenite capsular, avaliação da histiocitose subcapsular, avaliação da hiperplasia e hipertrofia de nódulos e folículos linfóides na região cortical e avaliação da hiperplasia e hipertrofia de macrófagos nos seios e cordões medulares (Lima *et al.*, 2004). O parâmetro semi-quantitativo da avaliação tecidual seguiu o adotado para baço como descrito anteriormente.

4) Pele abdominal, espelho nasal e orelha: avaliação da inflamação, avaliação da histiocitose e avaliação do parasitismo (Xavier *et al.*, 2006). O parâmetro semi-quantitativo da avaliação tecidual seguiu o adotado para baço como descrito anteriormente.

3.6 – Técnica de Imuno-histoquímica

Foi realizada a imuno-histoquímica em duas etapas distintas:

1) Imuno-histoquímica para marcação de formas amastigotas de *Leishmania* em material embebido em parafina (Tafari *et al.*, 2004), nos vários órgãos estudados, visando correlacionar as lesões com a presença do parasito nos órgãos;

2) Imuno-histoquímica para caracterização da integrina (CD11b/CD18 ou CR3), realizada através de lâminas histológicas confeccionadas por cortes em criostato.

3.6.1 – Soluções e anticorpos empregados na técnica:

- Soluções de Peróxido de Hidrogênio: Duas soluções foram preparadas: uma para o bloqueio da peroxidase endógena composta de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 4% , e outra para a revelação que consistia de peróxido de hidrogênio 40 volumes a 0,16%.
- Solução Reveladora de Diaminobenzidina: A solução foi preparada com Diaminobenzidina (DAB) a 0,024%, acrescida da solução de peróxido de hidrogênio descrita anteriormente.
- Solução Tampão Fosfato Salino (PBS- "*Phosphate Buffer Saline*"- pH 7,2, 0,01M): Entre as etapas da técnica, essa solução foi utilizada para lavagem das lâminas (três banhos consecutivos de cinco minutos).
- Anti-soro de bloqueio: Foi utilizado soro normal de cabra, na diluição de 1:50 para o bloqueio de sítios inespecíficos.
- Anti-soro e Anticorpos monoclonais (anticorpo primário): Para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* nos tecidos, utilizou-se um soro de cão naturalmente infectado na diluição de 1:100 (Tafari *et al.*, 2004). E para a caracterização de CR3 utilizou-se os anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD11b e anti-CD18 caninos (SEROTEC-USA).
- Anticorpo Secundário: Usamos o anti-soro de cabra anti-camundongo e coelho biotinilado da DAKO (LSAB 2 System, Peroxidase – K0675).

- Peroxidase Complexada com estrepto-avidina da DAKO (LSAB 2 System, Peroxidase – K0675)

3.6.2 – Reações imuno-histoquímicas: Técnica da estrepto-avidina peroxidase

Para detecção das formas amastigotas de *Leishmania* e para detecção tecidual das proteínas CD11b e CD18 (CR3), utilizou-se a técnica descrita por Tafuri *et al.*, (2004) que consiste das seguintes etapas:

- Lâminas provenientes blocos parafinados (para detecção de formas amastigotas de *Leishmania*) foram inicialmente desparafinadas em duas diferentes soluções de xilol por 10 minutos em cada;
- Lâminas provenientes de cortes em criostato (proteínas CD11b e CD18) e as lâminas provenientes de blocos parafinados, após lavagem em xilol foram então hidratadas em soluções de álcoois decrescentes, e a seguir, submetidas aos banhos em PBS;
- Bloqueio da peroxidase endógena foi feito adicionando-se ao banho de PBS o peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 4% (30 minutos a temperatura ambiente);
- Para o bloqueio das reações inespecíficas (relacionadas ao anticorpo secundário) adicionou-se soro normal de coelho e as lâminas incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente;
- Para formas amastigotas foi utilizado como anticorpo primário soro de cão naturalmente infectado na diluição de 1:100 em quantidade suficiente para cobrir os fragmentos. Para a reação anti-CR3 utilizou-se os anticorpos anti-CD11b e anti-CD18 em diferentes cortes na diluição de 1:100. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida por 18 a 24 horas em temperatura de 4°C;
- Adição do anticorpo secundário e incubação em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente;

- Emprego da Estrepto-avidina-peroxidase e incubação por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente;
- Revelação da peroxidase com a solução reveladora com peróxido de hidrogênio por cinco minutos à temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas em água corrente e contra-coloração com hematoxilina de Harris por três segundos;
- Lavagem, desidratação em álcoois crescentes, diafanização em xilol, e montagem com bálsamo Entelan™.

Para cada bateria de 20 lâminas utilizou-se um controle negativo e um positivo. O controle negativo, na imuno-histoquímica para amastigotas de *Leishmania*, foi feito utilizando-se soro de cão normal na diluição de 1:100 e/ou PBS, em substituição aos anticorpos primários. O controle positivo foi feito utilizando-se uma lâmina com corte histológico de órgãos de cães naturalmente infectados com alto parasitismo quando observado ao microscópio óptico na coloração pela H&E.(figuras 2a,b).

3.7 – Avaliações Morfométricas

Análises morfométricas foram realizadas para:

- Quantificação do parasitismo tecidual de formas amastigotas marcadas pela reação de imuno-histoquímica;
- Quantificação do número de células contendo imunomarcações para as proteínas CD11b e CD18;
- Quantificação da intensidade da expressão das proteínas constituintes dos receptores do crescimento do tipo 3.

Todas as análises foram realizadas no programa KS300 pertencente ao Laboratório de Processamento de Imagens, no Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG.

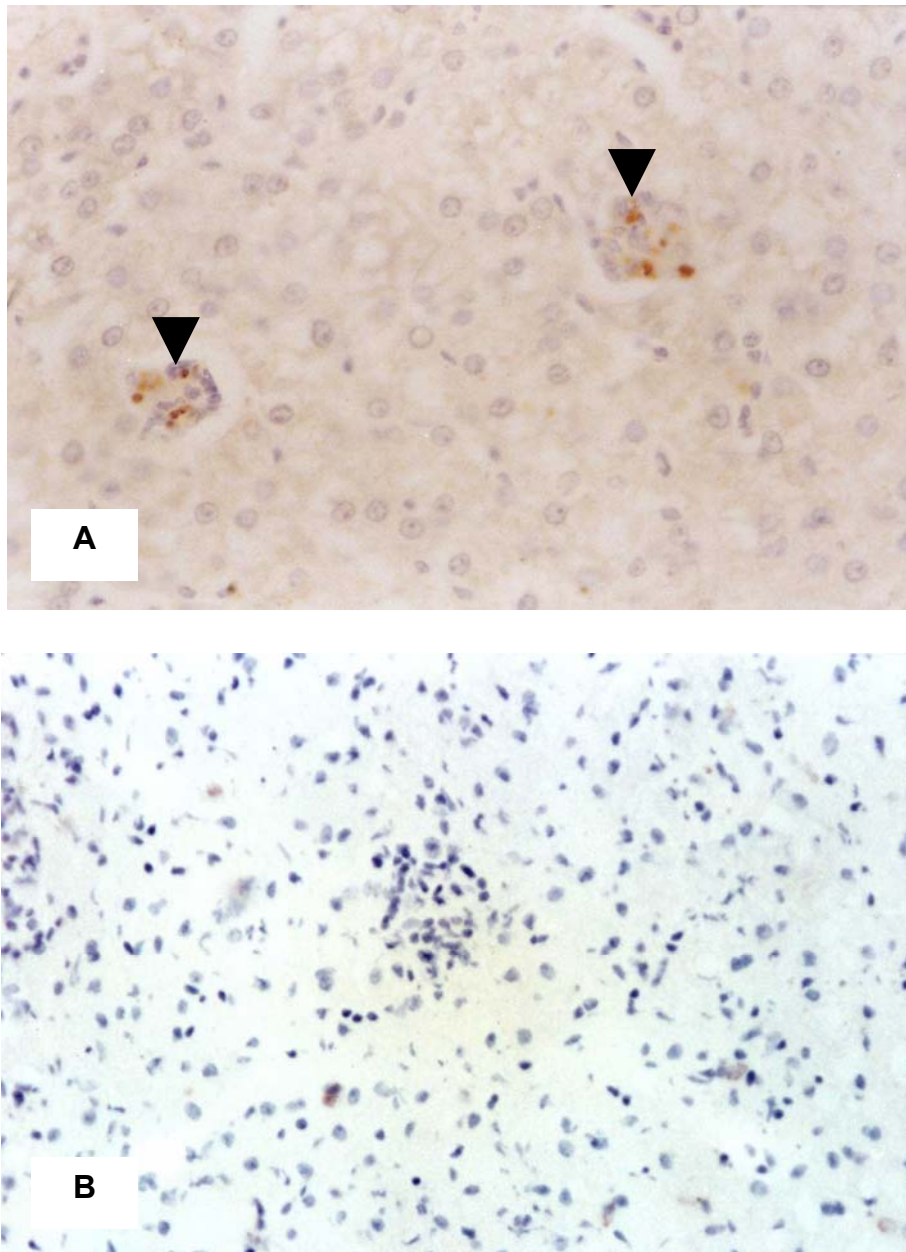


Figura 2: Corte histológico de fígado de cão naturalmente infectado por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Método de Imuno-histoquímica da estreptoavidina–peroxidase. (A) Controle positivo onde observamos formas amastigotas imuno-marcadas no interior de células de granulomas hepáticos (cabeça de setas) (220x). (B) Controle negativo em corte histológico contendo formas amastigotas, porém sem que haja imuno-marcação (220x).

3.7.1 – Quantificação do parasitismo tecidual

Em cada lâmina corada pela técnica da estrepto-avidina-peroxidase para determinação de formas amastigotas de *Leishmania* foram fotografados no microscópio óptico ZEISS com em microcâmara JVC-TK1270 acoplada e com função RGB (*red green blue*) ativada. Para cada lâmina foram fotografados 20 campos aleatórios, em objetiva de 40x (em tela de 640X480 *pixels*) como descrito por Caliarì (1997).

Em cada imagem obtida foi determinado no programa KS300, através da diferenciação de cor, o número de *pixels* correspondentes a imunomarcacão determinando-se a quantidade de formas amastigotas imunomarcadas.

3.7.2 – Quantificação do número de células positivas para a integrina CR3 (CD11b/CD18)

Lâminas coradas pela técnica da estrepto-avidina-peroxidase para determinação da expressão de CD11b e CD18 foram fotografadas seguindo procedimento descrito no item 3.7.1 e neles quantificado o número de células com marcação positiva para as duas proteínas estudadas.

3.7.3 – Quantificação da expressão densitométrica das proteínas CR3 (CD11b e CD18)

Lâminas coradas pela técnica da estrepto-avidina-peroxidase para a determinação da expressão de CD11b e CD18 foram fotografadas em número de campos variados para análise de duzentas células imunomarcadas. Todos os campos foram fotografados utilizando-se um filtro de polarização de interface GG495 (Schott, Mainz, Germany) (para polarização de luz de produtos gerados pela DAB) em microscópio óptico com microcâmara JVC-TK1270 com desativação de sinal RGB (imagem digitalizada em escala de cinza).

Duzentas células capturadas foram analisadas no software KS-300 utilizando-se um modelo macro padrão desenvolvido no Laboratório de Morfometria do ICB/ UFMG. Densidade óptica da expressão de CD11b e CD18 foi obtida através da intensidade da transmitância de luz, em incidência de 500nm como proposto pela Lei de Beer (Caliari *et al.*, 2006) (Figura 3a-f).

$$D.O. = \text{Log. } I$$

I

Onde:

D.O. = Densidade óptica

I = intensidade de transmitância.

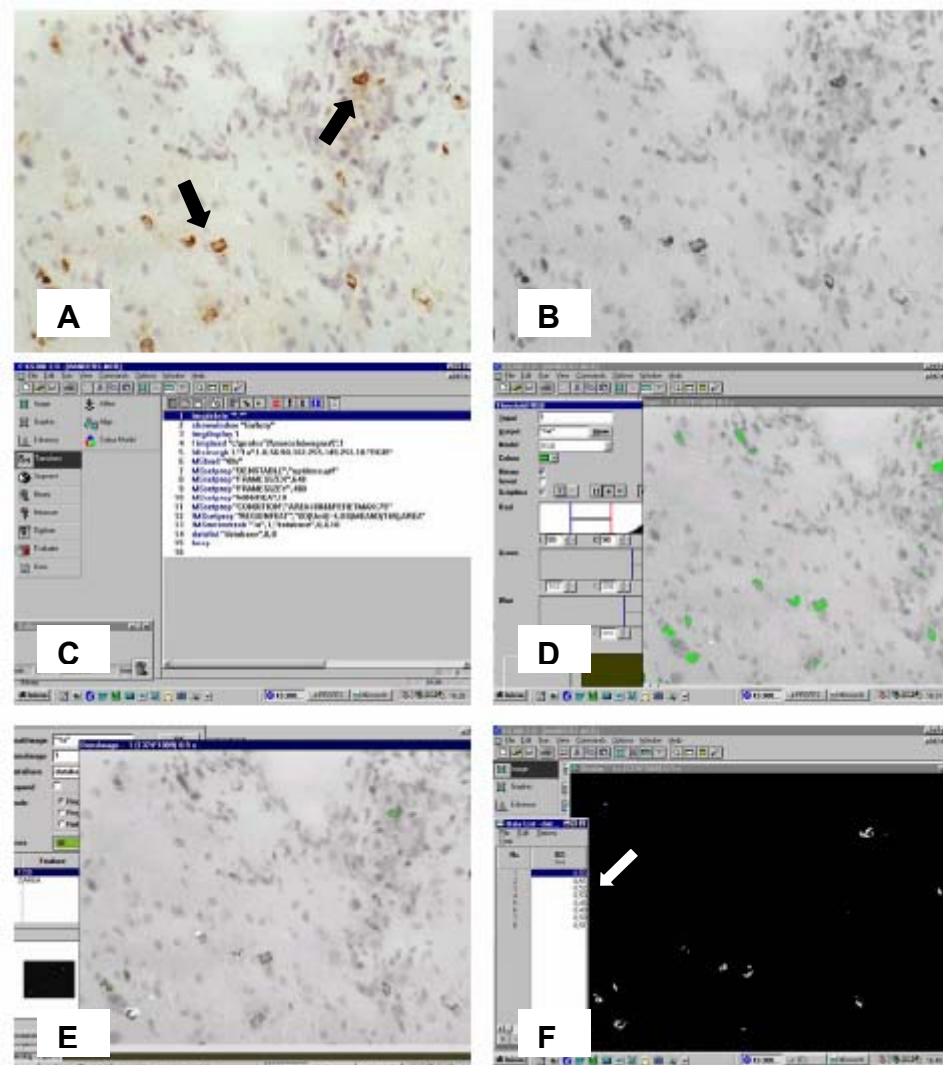


Figura 3: Avaliação densitométrica da expressão celular de CR3: (A) Imagem real apresentando células com marcação positiva para proteína CD11b (setas). (B) Imagem A utilizada para contagem densitométrica capturada em escala de cinza utilizando-se filtro de polarização para captação de emissão de luz de subprodutos de diaminobenzidina (DAB). (C) Macro de avaliação do programa KS300 apresentando passos automáticos da avaliação densitométrica. (D) Seleção de pixels da imagem correspondentes à cor da imuno-marcação da proteína CD11b (marcação em verde). (E) Imagem virtual de geração automática para seleção de células positivas. (F) Determinação da densidade da expressão da proteína CD11b em células selecionadas com quantificação automática (seta).

3.8 – Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas inferências ou descritivas tiveram o apoio da ESTATMG – Empresa Júnior de Consultoria em Estatística da UFMG e foram realizadas utilizando-se dos softwares INSTAT3 *for Windows* e PRISM versão 3.0.

Baseando-se na natureza da distribuição não paramétrica dos dados obtidos para o parasitismo dos animais, para análises de inferência entre dois dos grupos estudados foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para análises de correlação o teste aplicado foi o Coeficiente de Correlação de Spearman.

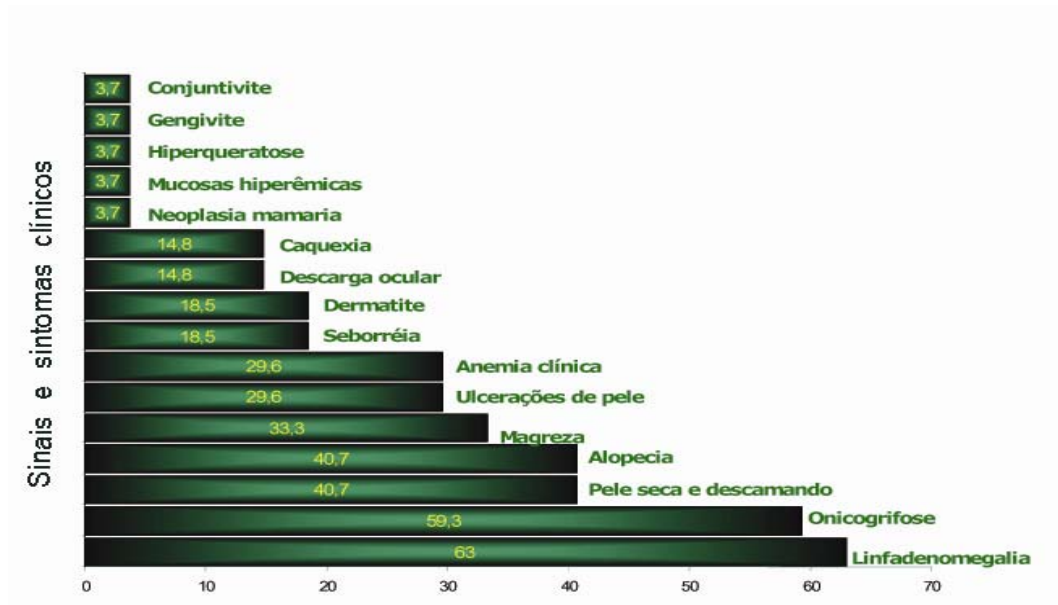
Dados obtidos para o número e expressão densitométrica das proteínas CD11b e CD18 apresentaram caráter de distribuição normal, sendo as inferências desses dados quando para dois grupos realizados pelo teste-T, para mais de dois grupos realizados no teste de variância da Tabela ANOVA e as análises de correlação pelo Coeficiente de Correlação de Pearson e pela matriz de correlação de Pearson com índice de significância menor que 5%.

4.0 – RESULTADOS

4.1 – Avaliação Clínica

As alterações clínicas encontradas nos animais sintomáticos estudados estão descritas no gráfico 01. Os animais sintomáticos apresentaram como alterações mais freqüentes a linfadenomegalia (63%), a onicogribose (59,3%), a magreza (33,3%), as ulcerações de pele (29,6%), a caquexia (14,8%), e a anemia clínica (29,6%).

Gráfico 01 – Sinais e sintomas clínicos apresentados por animais naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*



4.2 – Índice da LDU (*Leishman Donovan Units*)

4.2.1 – LDU do baço

Os índices de LDU encontrados no baço dos animais infectados estão representados no gráfico 02. A análise dos dados não revelou diferenças estatísticas existentes entre os grupos clínicos e a LDU apresentada pelo baço dos animais ($p=0.3247$; teste de *Mann-Whitney*).

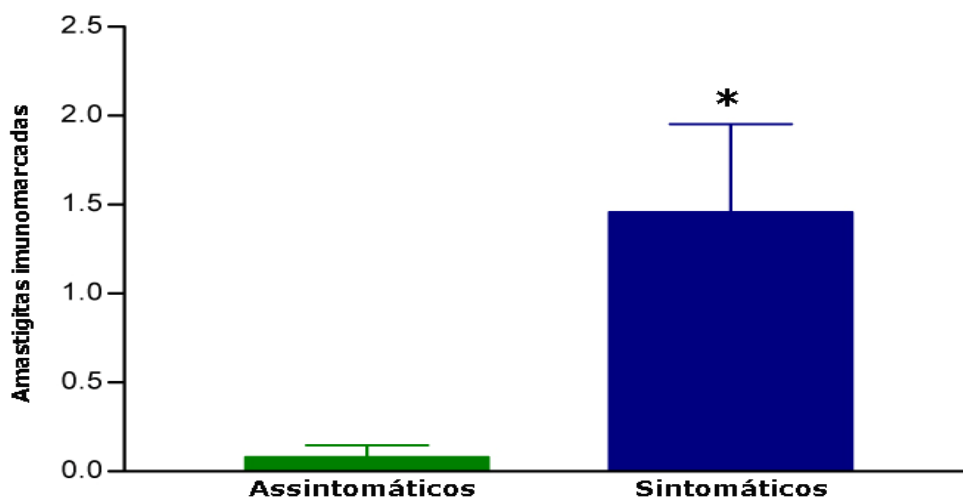
Ao se comparar o parasitismo entre os linfonodos estudados e todos os animais naturalmente infectados, maiores índices de LDU são observados em linfonodos cervicais, porém nenhuma diferença foi encontrada entre eles ($p=0.0930$; teste de *Kruskal-Wallis*).

4.3 – Parasitismo tecidual pela técnica da Imuno-histoquímica

4.3.1 – Parasitismo tecidual no baço

O parasitismo tecidual encontrado no baço de animais infectados está descrito no gráfico 04.

Gráfico 04 – Parasitismo tecidual pela técnica da imuno-histoquímica no baço de animais naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*

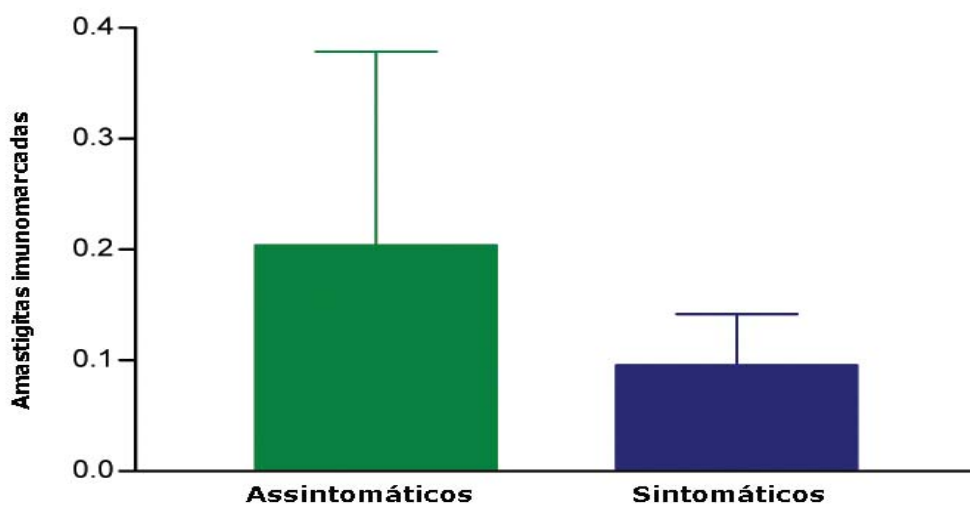


Baços de animais sintomáticos apresentaram maior parasitismo tecidual em relação aos animais assintomáticos ($p=0.0221$; teste-T).

4.3.2 – Parasitismo tecidual no fígado

O parasitismo tecidual encontrado no fígado de animais infectados está descrito no gráfico 05.

Gráfico 05 – Parasitismo tecidual pela técnica da imuno-histoquímica no fígado de animais naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*



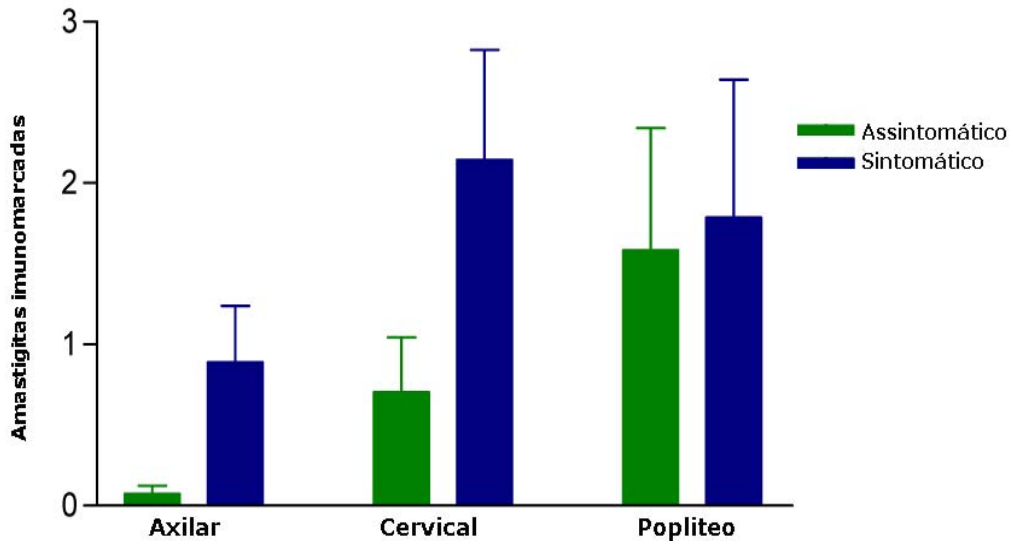
Não foi encontrada diferenças no parasitismo tecidual entre os grupos clínicos de animais infectados estudados.

4.3.3 – Parasitismo tecidual nos linfonodos

O parasitismo tecidual encontrado nos linfonodos dos animais infectados está descrito no gráfico 06. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos clínicos de animais assintomáticos e sintomáticos para os linfonodos axilares e poplíteos. Entretanto, os linfonodos cervicais dos animais sintomáticos apresentaram maior parasitismo tecidual que animais assintomáticos ($p=0.0421$; teste-T).

A análise do parasitismo independente da classificação clínica revelou maiores índices de parasitismo tecidual para os linfonodos cervicais e poplíteos quando comparados ao linfonodo axilar, não sendo essa diferença, porém, estatisticamente significativa.

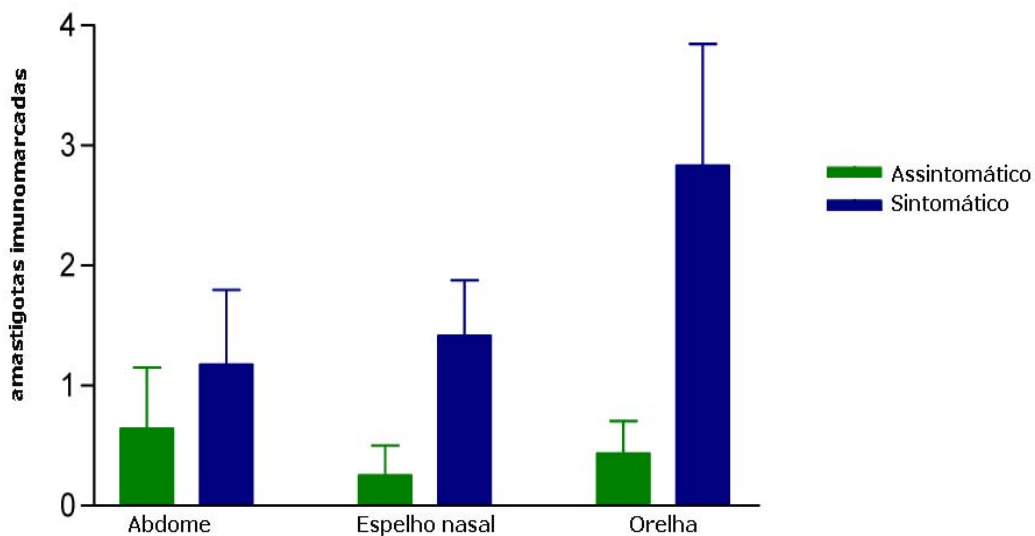
Gráfico 06 – Parasitismo tecidual pela técnica da imuno-histoquímica nos linfonodos de animais naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*



4.3.4 – Parasitismo tecidual na pele

O parasitismo tecidual encontrado nas biopsias de pele das regiões anatômicas como do abdome, do espelho nasal e da orelha dos animais infectados está descrito no gráfico 07. Não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre os grupos clínicos estudados em nenhum das três regiões da pele.

Gráfico 07 – Parasitismo tecidual pela técnica da imuno-histoquímica na pele de animais naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.



A comparação entre peles revelou maiores índices de parasitismo para a pele da região da orelha, porém, a diferença encontrada não se mostrou ser estatisticamente significativa.

4.4 – Avaliações anátomo-patológicas

4.4.1 – Avaliações macroscópicas

O fígado e o baço, em geral, apresentaram-se aumentados de tamanho e peso, sendo a congestão um achado freqüente e caracterizada pela presença de sangue à superfície de corte. O baço em especial, sempre se mostrava de aspecto rugoso que ao corte revelava além da congestão, a hipertrofia e hiperplasia da polpa branca. Os linfonodos eram sempre reativos, em especial os linfonodos cervicais, sendo que os mesmos apresentavam-se aumentados de tamanho, e ao corte, deixavam fluir um líquido de aspecto leitoso. A cortical era facilmente identificada, pois era de coloração brancacenta e proeminente em relação à superfície.

4.4.2 – Avaliações histopatológicas microscópicas no baço

As principais alterações histopatológicas encontradas no baço de todos os animais estão descritas na tabela 01. A hiperplasia e hipertrofia da polpa branca foi a alteração freqüentemente encontrada variando na maioria dos animais nos padrões de intensidade de discreto a moderado (83,3%). Resultado semelhante foi observado também na polpa vermelha (83,4%). Além disso, nessa região, foram observados um grande número de plasmócitos (plasmocitose) e macrófagos e em menor número polimorfonucleares neutrófilos. Os casos mais intensos dessa hiperplasia foram sempre associados a animais de perfil sintomático (30% para esse grupo) não sendo descrito em outros perfis clínicos. Entretanto, a presença de agregados de macrófagos parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* (granulomas) foi observada em ambos os grupos de animais sendo cinco assintomáticos e em dois sintomáticos. A congestão também foi uma alteração muito encontrada e novamente, na maioria dos casos, manteve-se entre os graus de discreta a moderada (80%). A inflamação e o espessamento da cápsula também foram observados em alguns animais. A depleção e não reatividade dessa região somente foi observada em animais de perfil clínico sintomático (10%). (Figuras 4a-f).

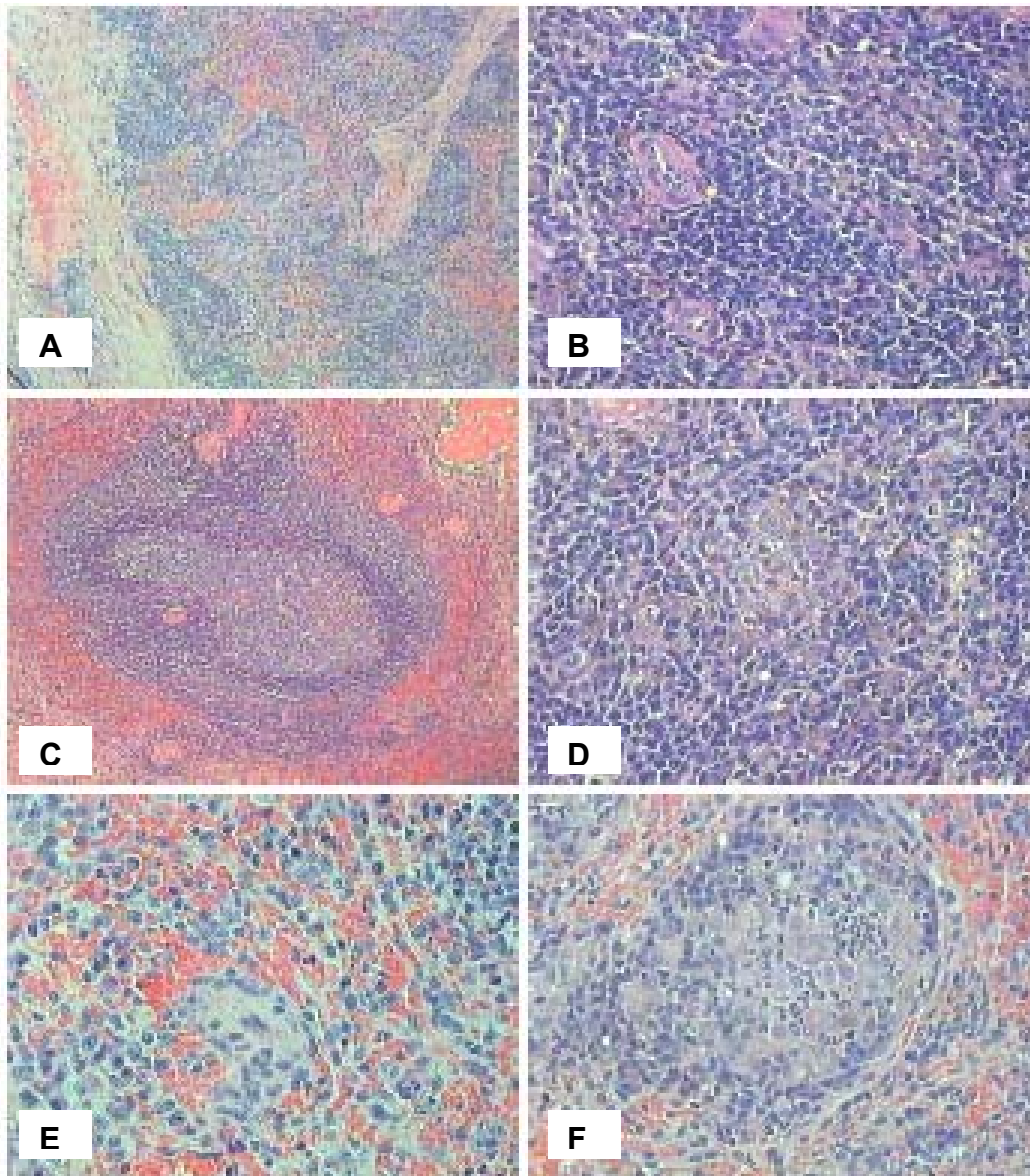


Figura 4: Alterações histopatológicas no baço de animais naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: (A) Cápsula apresentando presença de células inflamatórias e espessamento discreto. H&E. 40X (B) Região da polpa branca não reativa com substituição das populações de linfócitos por macrófagos às vezes parasitados. H&E. 440X. (C) Região da polpa branca reativa, apresentando exuberante folículo linfóide. H&E. 220X. (D) Região da polpa vermelha apresentando grande hipertrofia e hiperplasia de macrófagos. H&E. 440X. (E) Região da polpa vermelha apresentando congestão intensa. H&E. 440X. (F) Região da polpa apresentando formações agregadas concêntricas de macrófagos (granulomas).

Tabela 01. – Avaliação histopatológica do baço de cães controle e cães naturalmente infectados.

LESÃO	GRAU DA LESÃO				
	Ausente	Discreta	Moderada	Intensa	
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	
CONTROLES	<i>Espessamento de cápsula</i>	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>Inflamação da cápsula</i>	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha</i>	6 (60%)	2 (20%)	2 (20%)	0 (0%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia da polpa branca</i>	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Congestão</i>	5 (50%)	2 (20%)	3 (30%)	0 (0%)
	<i>Hemossiderose</i>	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Depleção de Polpa Branca e Bainha periarteriolar</i>	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
INFECTADOS	<i>Espessamento de cápsula</i>	22 (73,3%)	4 (13,3%)	2 (6,7%)	2 (6,7%)
	<i>Inflamação da cápsula</i>	19 (63,4%)	4 (13,3%)	4 (13,3%)	3 (10%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha</i>	2 (6,7%)	10 (33,3%)	15 (50%)	3 (10%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia da polpa branca</i>	1 (3,3%)	16 (53,4%)	9 (30%)	4 (13,3%)
	<i>Congestão</i>	2 (6,7%)	17 (56,7%)	7 (23,3%)	4 (13,3%)
	<i>Hemossiderose</i>	4 (13,3%)	16 (53,4%)	7 (23,3%)	3 (10%)
	<i>Depleção de Polpa Branca e Bainha periarteriolar</i>	4 (13,3%)	10 (33,3%)	3 (30%)	3 (30%)

4.4.3 – Avaliações histopatológicas microscópicas no fígado

As principais alterações histopatológicas encontradas no fígado de todos os animais estudados estão descritas na tabela 02.

A exceção do número e granulomas, lesão a qual animais assintomáticos apresentaram maior número de granulomas hepáticos que animais sintomáticos ($p=0.0018$; teste-T), nenhuma diferença no padrão de lesões teciduais hepáticas pode ser observada entre esses grupos de animais. A hiperplasia e a hipertrofia da célula de Kupffer e a presença de granulomas foram às lesões de maior incidência, sendo encontradas em todos os animais infectados. Lesões como a congestão nos capilares

sinusóides, inflamação portal e da cápsula e a presença de fenômenos degenerativos apresentaram-se em grau amplamente variado, em alguns casos apresentando um perfil discreto e em outros um perfil intenso (Figuras 5 a-f).

Tabela 02. – Avaliação histopatológica dos linfonodos axilares de cães naturalmente infectados.

LESÃO	Ausente n(%)	GRAU DA LESÃO		
		Discreto n(%)	Moderado n(%)	Intenso n(%)
<i>Fenômenos degenerativos</i>	3 (30%)	2 (20%)	5 (50%)	0 (0%)
<i>Inflamação da cápsula</i>	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CONTROLES <i>Inflamação portal</i>	8 (80%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Congestão sinusoidal</i>	4 (40%)	5 (50%)	1 (10%)	0 (0%)
<i>Hipertrofia e hiperplasia das cels. de Kupffer</i>	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Hemossiderose</i>	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Presença de granulomas</i>	10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Fenômenos degenerativos</i>	3 (10%)	6 (20%)	14 (46,6%)	7 (23,3%)
<i>Inflamação da cápsula</i>	7 (23,3%)	13 (43,3%)	5 (16,7%)	5 (16,7%)
INFECTADOS <i>Inflamação portal</i>	4 (13,3%)	10 (33,3%)	11 (36,6%)	5 (16,7%)
<i>Congestão sinusoidal</i>	2 (6,7%)	7 (23,3%)	12 (40%)	9 (30%)
<i>Hipertrofia e hiperplasia das cels. de Kupffer</i>	0 (0%)	8 (26,7%)	14 (46,6%)	8 (26,7%)
<i>Hemossiderose</i>	25 (83,3%)	5 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Presença de granulomas</i>	0 (0%)	11 (36,6%)	9 (30%)	10 (33,3%)

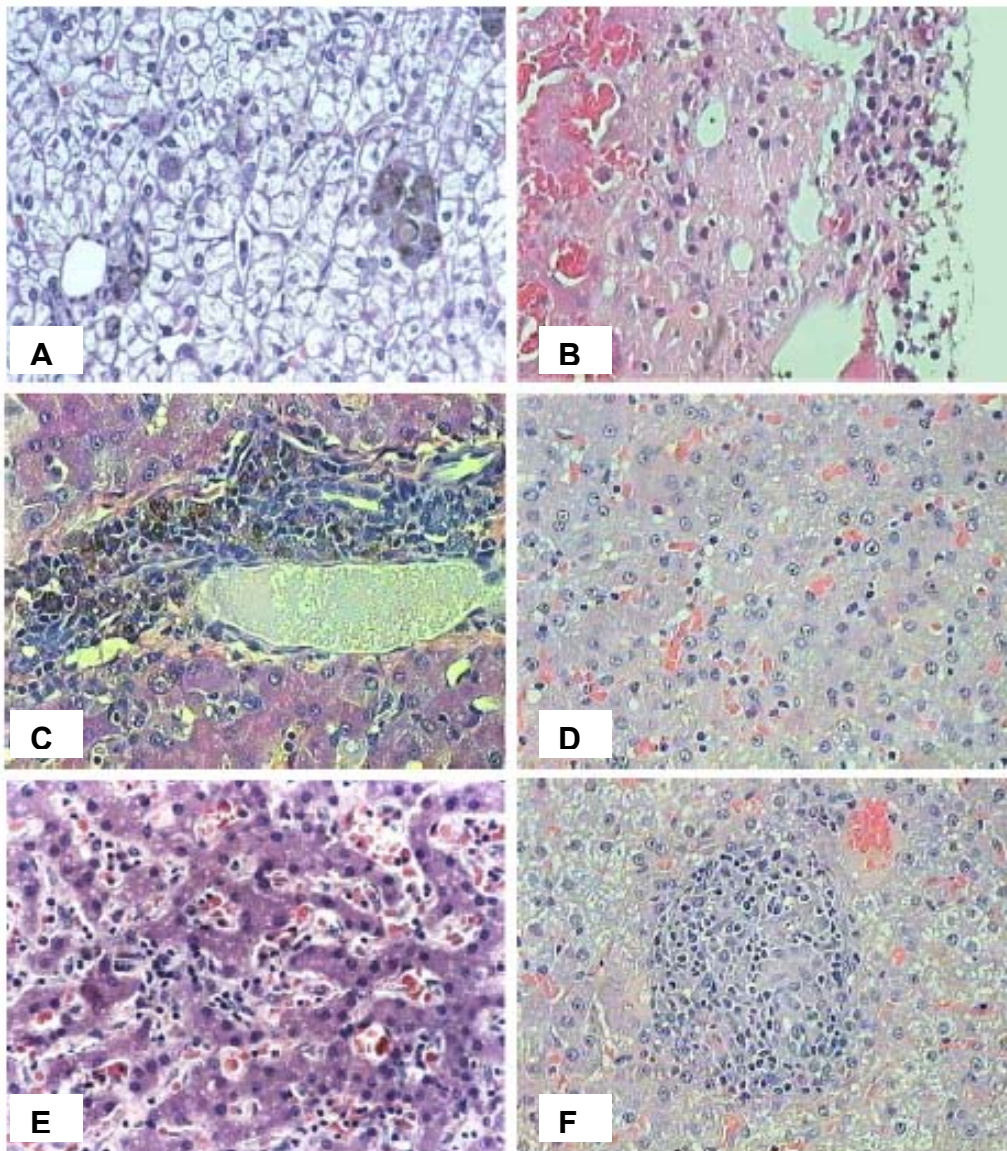


Figura 5: Alterações histopatológicas no fígado de animais naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (A) Processos degenerativos H&E. 220X. (B) Presença moderada de células inflamatórias e espessamento da cápsula. H&E. 440X. (C) Presença de infiltrado inflamatório peri-portal. H&E. 440X. (D) Hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer no parênquima hepático. H&E. 220X. (E) congestão sinuzoidal. H&E. 220X. (F) Formação de granulomas intralobulares. H&E. 220X

4.4.4 - Avaliações histopatológicas microscópicas nos linfonodos

As principais alterações histopatológicas encontradas nos linfonodos de todos os animais estão descritas nas tabelas 03, 04 e 05.

Tabela 03. – Avaliação histopatológica dos linfonodos axilares de cães naturalmente infectados.

LESÃO	Ausente n(%)	GRAU DA LESÃO			
		Discreto n(%)	Moderado n(%)	Intenso n(%)	
CONTROLES	<i>Inflamação da cápsula</i>	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Linfadenite subcapsular</i>	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de nódulos linfóides</i>	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de macrófagos</i>	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Congestão</i>	5 (50%)	3 (30%)	1 (10%)	1 (10%)
	<i>Hemossiderose</i>	4 (40%)	3 (30%)	2 (20%)	1 (10%)
INFECTADOS	<i>Inflamação da cápsula</i>	3 (10%)	15 (50%)	9 (30%)	3 (10%)
	<i>Linfadenite subcapsular</i>	2 (6,7%)	18 (60%)	8 (22,6%)	2 (6,7%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de nódulos linfóides</i>	5 (16,6%)	11 (36,6%)	8 (22,8%)	6 (20%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de macrófagos</i>	0 (0%)	4 (13,3%)	19 (63,4%)	7 (23,3%)
	<i>Congestão</i>	27 (90%)	2 (6,7%)	1 (3,3%)	0 (0%)
	<i>Hemossiderose</i>	27 (90 %)	1 (3,3%)	2 (6,7%)	0 (0%)

Tabela 04. – Avaliação histopatológica do linfonodo cervical de cães naturalmente infectados.

LESÃO	GRAU DA LESÃO				
	Ausente n(%)	Discreto n(%)	Moderado n(%)	Intenso n(%)	
CONTROLES	<i>Inflamação da cápsula</i>	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>Linfadenite subcapsular</i>	7 (70%)	2 (20%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de nódulos linfóides</i>	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de macrófagos</i>	7 (70%)	2 (20%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Congestão</i>	5 (50%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>Hemossiderose</i>	4 (40%)	5 (50%)	0 (0%)	1 (10%)
INFECTADOS	<i>Inflamação da cápsula</i>	2 (6,7%)	19 (63,3%)	7 (23,3)	2 (6,7%)
	<i>Linfadenite subcapsular</i>	5 (16,7%)	15 (50%)	9 (30%)	1 (3,3%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de nódulos linfóides</i>	1 (3,3%)	13 (43,3%)	11 (36,7%)	5 (16,7%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de macrófagos</i>	0 (0%)	11 (36,7%)	16 (53,3%)	3 (10%)
	<i>Congestão</i>	22 (73%)	5 (16,7%)	1 (3,3%)	2 (6,7%)
	<i>Hemossiderose</i>	27 (90%)	0 (0%)	3 (10%)	0 (0%)

Os animais infectados apresentaram padrões semelhantes de alterações teciduais nos três linfonodos estudados. Assim, nenhuma diferença entre os grupos de animais infectados pode ser observada. Na cápsula foi verificada a tendência a apresentar um quadro inflamatório variando de discreto a moderado (80%, 87% e 80% para todos os casos nos linfonodos axilares, cervicais e poplíteos respectivamente), o mesmo sendo observado na região subcapsular (82,6%, 80% e 77,6%). A hiperplasia e hipertrofia de nódulos linfóides na região cortical foi altamente variada entre graus discretos a intensos e a hiperplasia e hipertrofia de macrófagos nos linfonodos apresentou, em sua maioria, o padrão de intensidade moderado (63,4%, 53,3% e 63,4%). Congestão e presença de hemossiderina foram alterações encontradas com baixa frequência nos três linfonodos (Figuras 6 a-f).

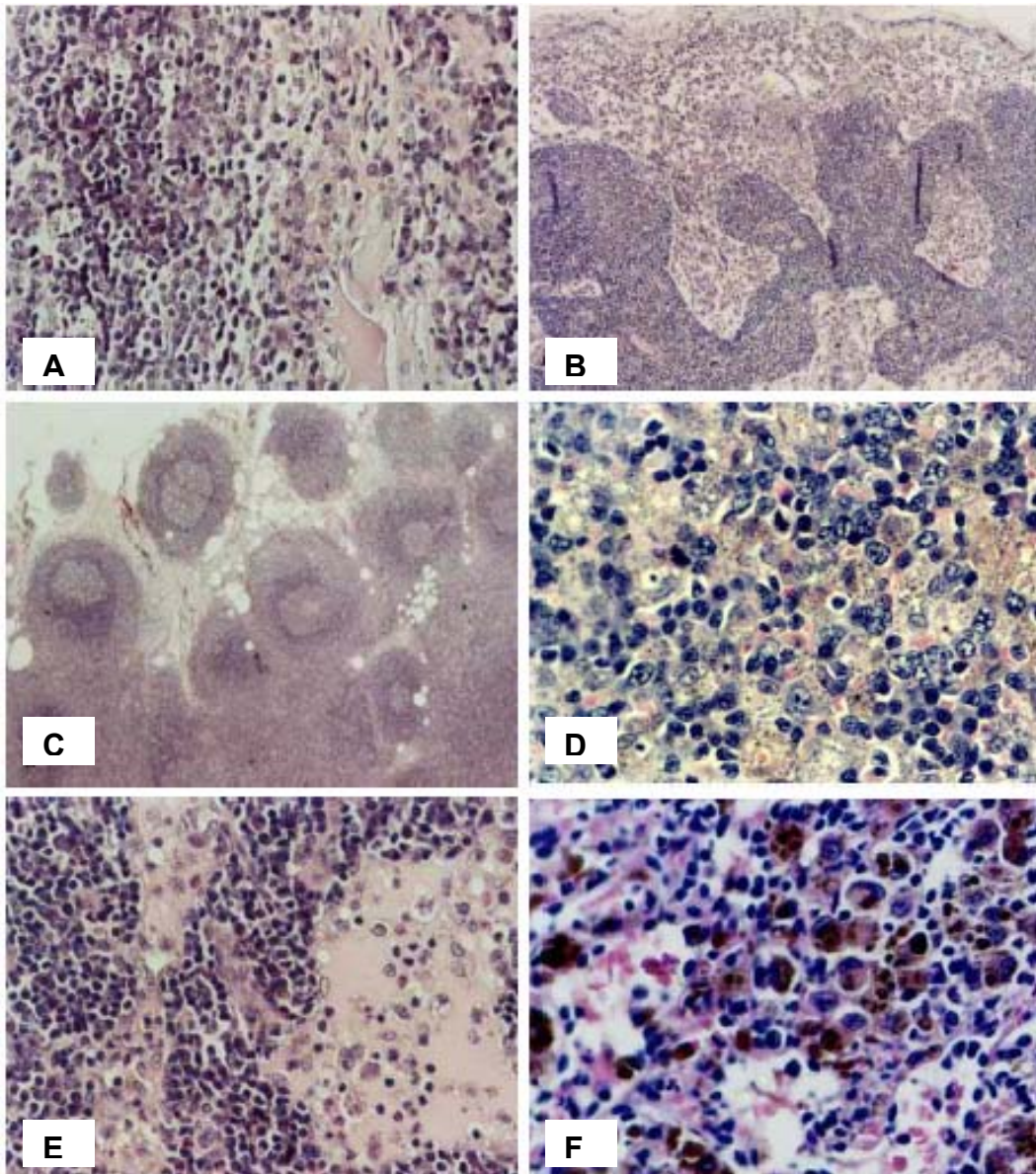


Figura 6: Alterações histopatológicas nos linfonodos de animais naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: (A) Linfonodo cervical. Cápsula apresentando linfadenite intensa. H&E. 40X (B) Linfonodo cervical. Histiocitose intensa na região dos seios subcapsulares. H&E. 220X. (C) Linfonodo cervical. Região cortical apresentando intensa hipertrofia e hiperplasia de nódulos e folículos linfóides. H&E. 220X. (D) Linfonodo poplíteo. Região cortical apresentando substituição da população linfocitária por macrófagos abarrotados por formas amastigotas de *Leishmania*. H&E. 440X. (E) Linfonodo poplíteo. Região medular apresentando hipertrofia e hiperplasia de macrófagos nos cordões e espessamento e presença da líquido acidofílico na região dos seios (seta). H&E. 220X (E). Linfonodo cervical. Presença de cristais de hemossiderina na região de cordões e seios medulares. H&E. 440X.

Tabela 05. – Avaliação histopatológica do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados.

LESÃO	Ausente n(%)	GRAU DA LESÃO			
		Discreto n(%)	Moderado n(%)	Intenso n(%)	
CONTROLES	<i>Inflamação da cápsula</i>	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Linfadenite subcapsular</i>	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de nódulos linfóides</i>	8 (80%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de macrófagos</i>	7 (70%)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)
	<i>Congestão</i>	4 (40%)	5 (50%)	1 (10%)	0 (0%)
	<i>Hemossiderose</i>	4 (40%)	3 (30%)	1 (10%)	2 (10%)
INFECTADOS	<i>Inflamação da cápsula</i>	3 (10%)	15 (50%)	9 (30%)	3 (10%)
	<i>Linfadenite subcapsular</i>	2 (6,7%)	18 (60%)	8 (22,6%)	2 (6,7%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de nódulos linfóides</i>	5 (16,6%)	11 (36,6%)	8 (22,8%)	6 (20%)
	<i>Hiperplasia e hipertrofia de macrófagos</i>	0 (0%)	4 (13,3%)	19 (63,4%)	7 (23,3%)
	<i>Congestão</i>	27 (90%)	2 (6,7%)	1 (3,3%)	0 (0%)
	<i>Hemossiderose</i>	27 (90%)	1 (3,3%)	2 (6,7%)	0 (0%)

4.4.5– Avaliações histopatológicas microscópicas na pele

Os dados histopatológicos da pele de todos os animais estão apresentados na tabela 06.

A alteração fundamental encontrada, em todos os fragmentos de pele de todos os animais infectados, foi uma inflamação crônica sempre caracterizada por um infiltrado celular de mononucleares (histio-plasmo-lymfocitário). O exsudato apresentava-se localizado ao redor dos vasos e anexos da derme profunda e/ou difuso na derme superficial. A avaliação semi-quantitativa ocorreu da seguinte maneira: (+) discreta, exsudato celular difuso na derme superficial; (++) moderado, exsudato celular difuso na derme superficial e em focos na derme profunda; (+++) intenso, exsudato celular distribuído difusamente por todas as camadas da pele. Então, os animais infectados apresentaram um padrão variado de intensidade inflamatória com tendência a

ausência (76% e 80% para abdome e espelho nasal, respectivamente) ou padrões discreto e moderado nas peles das diferentes regiões anatômicas. Entretanto, fragmentos de pele da orelha apresentaram um quadro inflamatório mais freqüente, variando de discreto a moderado (66%) e intenso em 17% dos animais.

Tabela 06. – Avaliação histopatológica da pele de animais controle e animais naturalmente infectados

Animais	GRAU DA LESÃO				
	Ausente n(%)	Discreto n(%)	Moderado n(%)	Intenso n(%)	
CONTROLES	<i>Pele do Abdome</i>	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>Pele do espelho nasal</i>	8 (80%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>Pele da Orelha</i>	5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)	0 (0%)
INFECTADO	<i>Pele do Abdome</i>	23 (76%)	5 (17%)	2 (7%)	0 (0%)
	<i>Pele do espelho nasal</i>	24 (80%)	2 (7%)	3 (10%)	1 (3%)
	<i>Pele da Orelha</i>	5 (17%)	11 (36%)	9 (30%)	5 (17%)

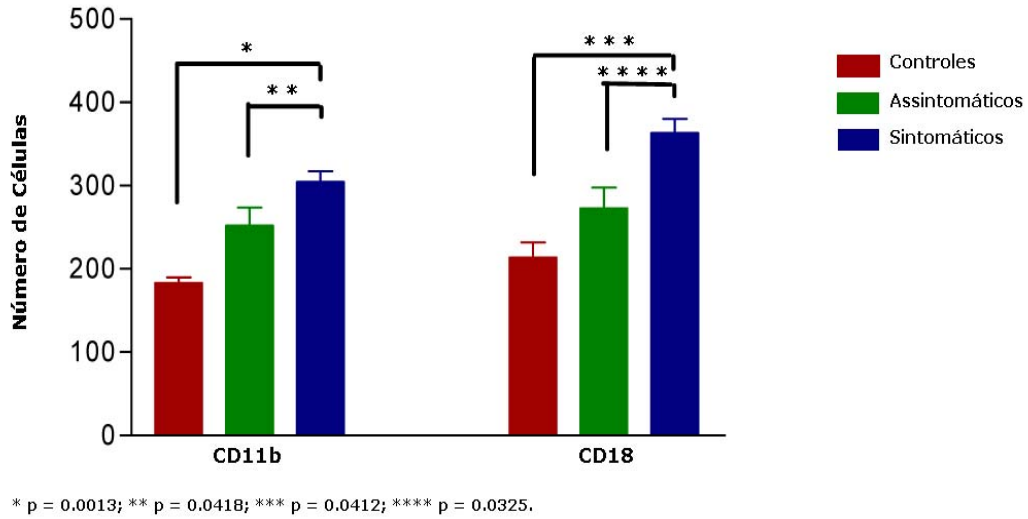
4.5 – Avaliação da expressão celular de CR3 (CD11b/CD18)

4.5.1 - Expressão de CR3 (CD11b/ CD18) no baço

Os dados representativos da expressão celular de CD11b/ CD18 no baço de todos os animais estão representados no gráfico 08.

Animais naturalmente infectados expressaram uma maior quantidade de células positivas para marcação de CD11b que animais controle ($p=0,0052$; teste-T). A mesma diferença também foi observada na expressão de CD18 ($p=0,0112$; teste-T). Na comparação entre os grupos clínicos estudados, animais naturalmente infectados sintomáticos apresentaram maior número de células positivas para CD11b ($p=0,0418$; teste-T) e CD18 ($p=0,0325$; teste-T).

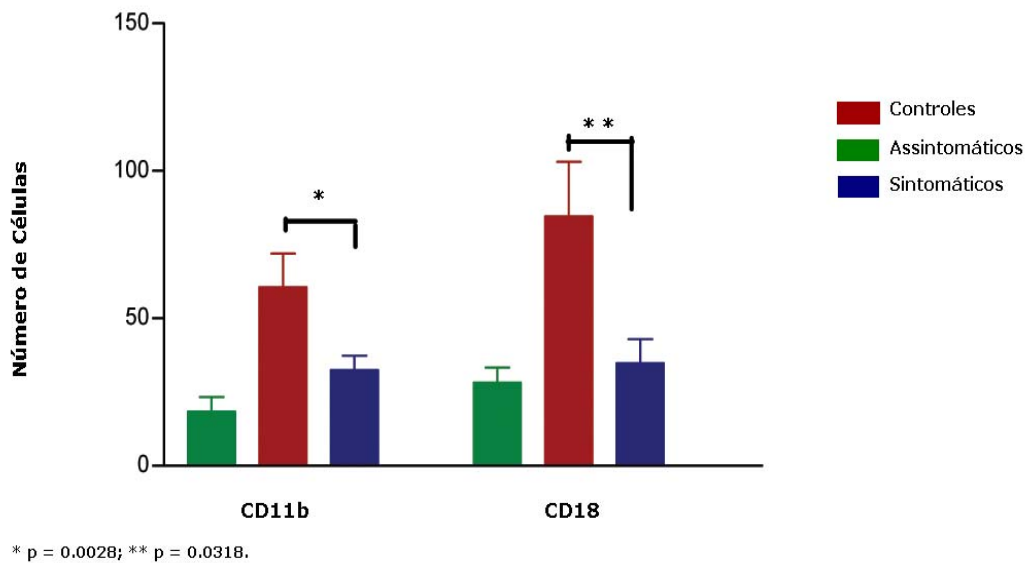
Gráfico 08 – Número de células expressando CD11b e CD18 no baço de animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.



4.5.2 - Expressão de CR3 (CD11b/ CD18) no fígado

Os dados representativos da expressão celular de CD11b/CD18 no fígado de todos os animais estão representados no gráfico 09.

Gráfico 09 – Número de células expressando CD11b e CD18 no fígado de animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.

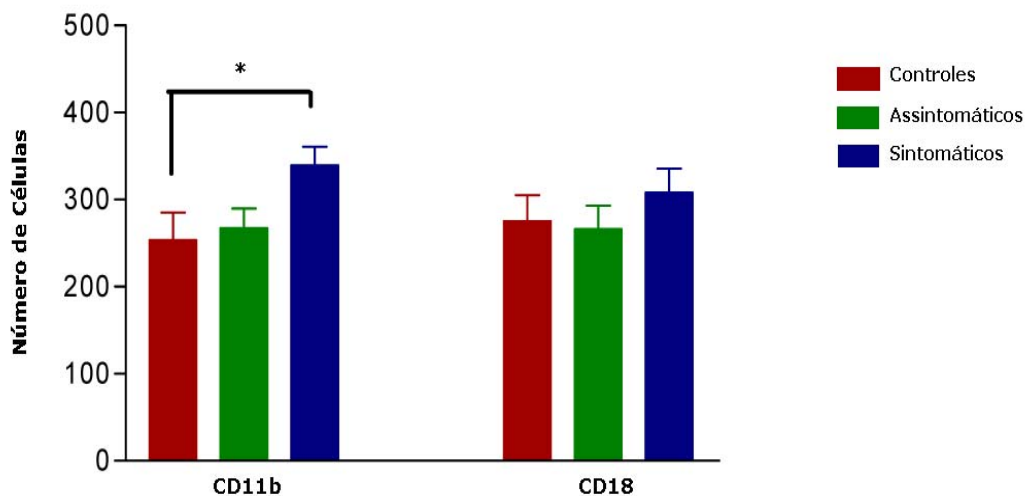


Animais naturalmente infectados expressaram uma maior quantidade de células positivas para marcação de CD11b que animais controle ($p=0,0320$; teste-T). A mesma diferença também foi observada na expressão de CD18 ($p=0,045$; teste-T). Na comparação entre os grupos clínicos estudados, animais naturalmente infectados assintomáticos apresentaram maior número de células positivas para CD11b ($p=0,0028$; teste-T) e CD18 ($p=0,0318$; teste-T) que animais sintomáticos.

4.5.3 - Expressão de CR3 (CD11b/ CD18) nos linfonodos

Os dados representativos da expressão celular de CD11b/ CD18 nos linfonodos de todos os animais estão representados nos gráficos 09-11.

Gráfico 09 - Número de células expressando CD11b e CD18 nos linfonodos axilares de animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.



* $p = 0.0311$.

Para todos os três linfonodos estudados, animais infectados tiveram maior expressão da proteína CD11b quando comparado a animais controle ($p=0.0470$, 0.0280 e 0.0145 para axilar, cervical e poplíteo respectivamente; teste-T). O mesmo pode ser visto para a expressão da proteína CD18 ($p=0.033$, 0.0350 e 0.0471 ; teste-T).

Gráfico 10 - Número de células expressando CD11b e CD18 nos linfonodos cervicais de animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.

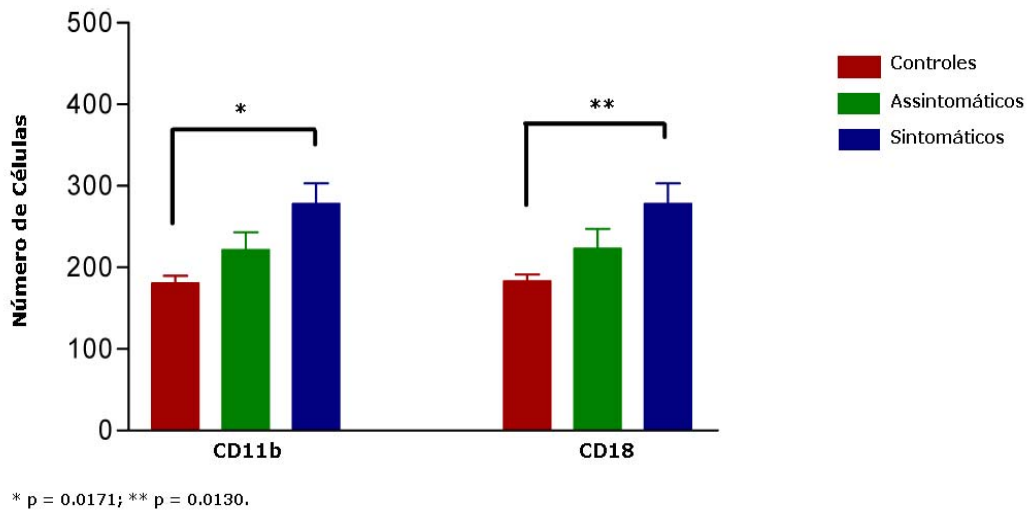
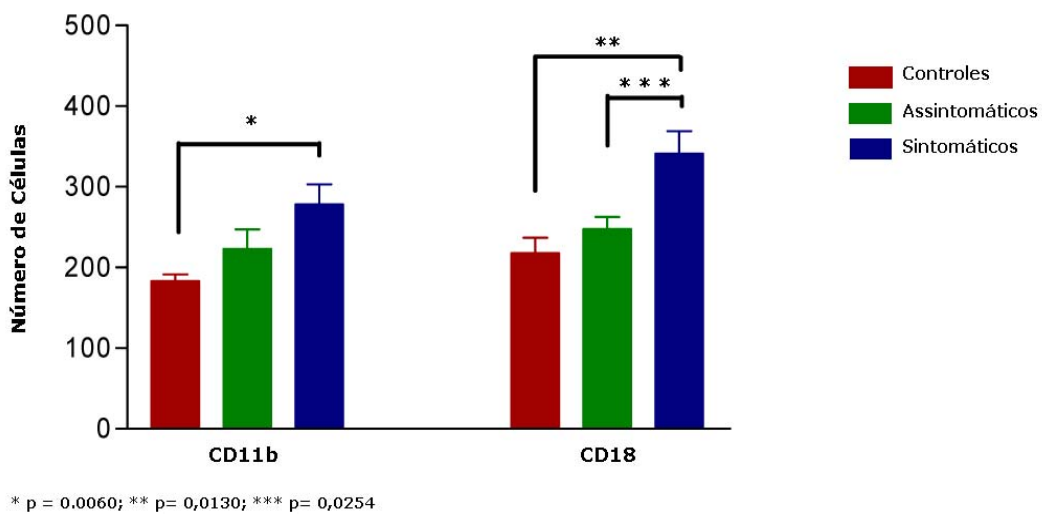


Gráfico 11 - Número de células expressando CD11b e CD18 nos linfonodos poplíteos de animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.



A análise comparativa da expressão dessas proteínas entre os grupos clínicos de animais infectados não revelou diferenças na expressão da proteína CD11b em nenhum dos linfonodos estudados e a proteína CD18 somente apresentou diferença significativa entre animais assintomáticos e sintomáticos no linfonodo poplíteo (p=0,0254; teste-T).

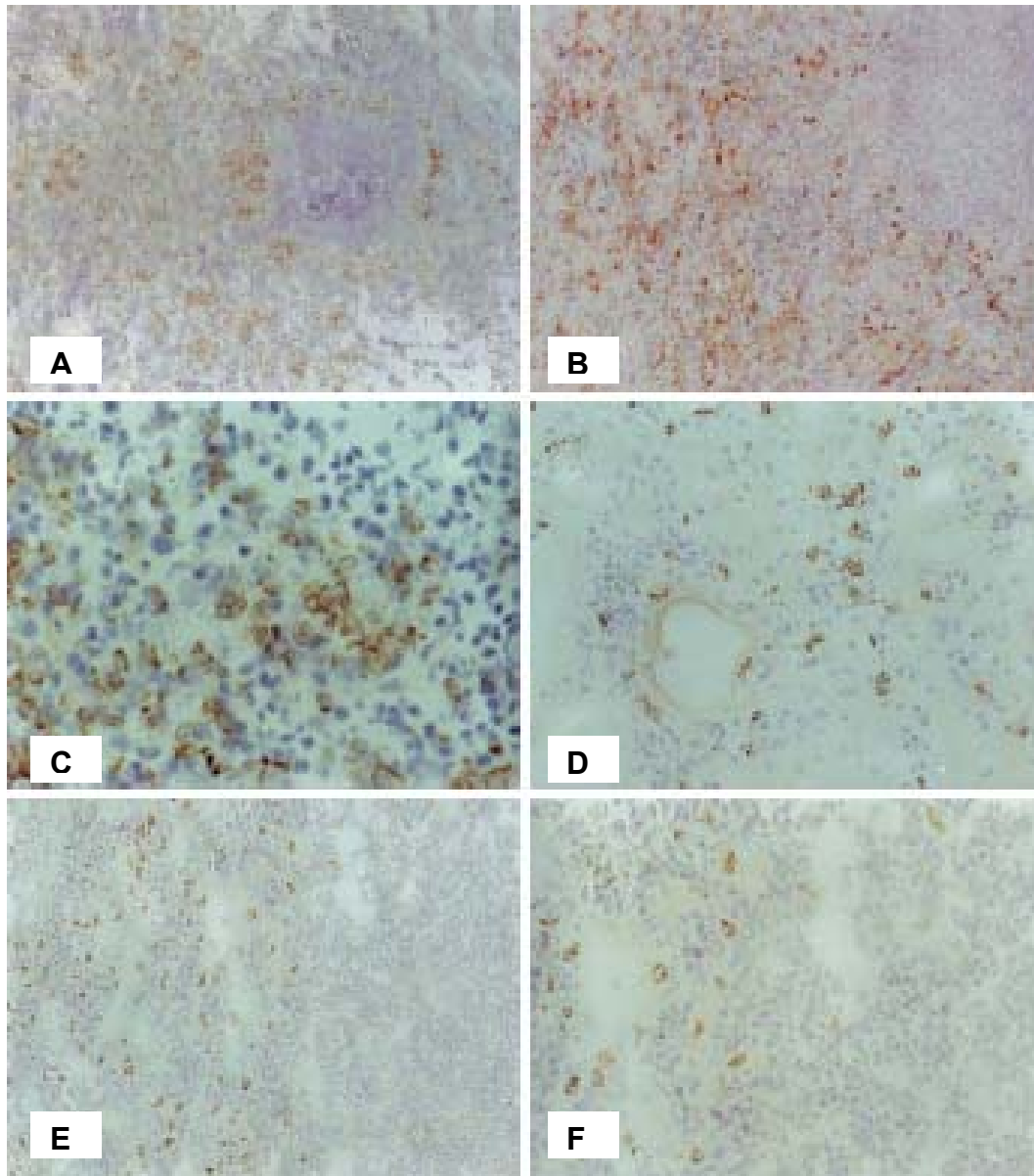


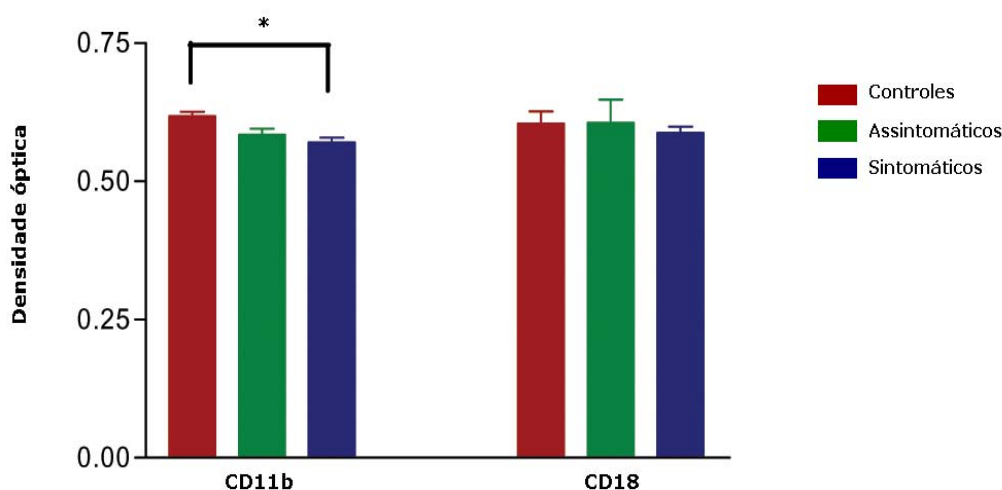
Figura 7: Expressão celular e densitométrica da expressão de CR3: (A) Baço. Marcação para CD11b. Visão panorâmica do padrão de marcação em “roda de carroça”, na zona marginal e na polpa vermelha. Estrepto-avidina-peroxidase. 110X. (B) Detalhe de A mostrando marcação na zona marginal da polpa branca. Estrepto-avidina-peroxidase. 220X. (C) Detalhe de B. Estrepto-avidina-peroxidase. 440X. (D) Fígado. Marcação para CD18. Presença de células imuno-marcadas distribuídas eo redor do parênquima hepático. Estrepto-avidina-peroxidase. 220X. (E) Linfonodo cervical. Marcação para CD18. Padrão de imuno-marcação co predominância de células positivas na região dos cordões medulares. Estrepto-avidina-peroxidase. 110X (F) Detalhe de E. Estrepto-avidina-peroxidase. 220X.

4.6 - Análises densitométricas da expressão de CR3 (CD11b/CD18).

4.6.1 – Análises densitométricas das células do baço

Os dados da expressão densitométrica de CD11b e CD18 no baço dos animais controle e naturalmente infectados estão apresentados no gráfico 12.

Gráfico 12 – Expressão celular densitométrica CD11b e CD18 no baço de animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.



*p = 0,0220

Células de animais infectados apresentaram, no baço, maior densidade da proteína CD11b ($p= 0.0029$; teste-T) que os animais controle, mas essa diferença não foi observada para a expressão celular da proteína CD18. Animais sintomáticos também apresentaram maior expressão celular de CD11b quando comparados aos animais não infectados ($p=0.0220$; teste-T). Para a expressão celular de CD11b nenhuma diferença foi observada entre a expressão celular nos grupos de animais infectados, resultado semelhante ao encontrado para a expressão da proteína CD18.

4.6.2 – Análises densitométricas nos linfonodos

Os dados da expressão densitométrica de CD11b e CD18 no linfonodos de todos os animais estão apresentados no gráfico 13 a 15.

Gráfico 13 – Expressão celular densitométrica CD11b e CD18 no linfonodo axilar de animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.

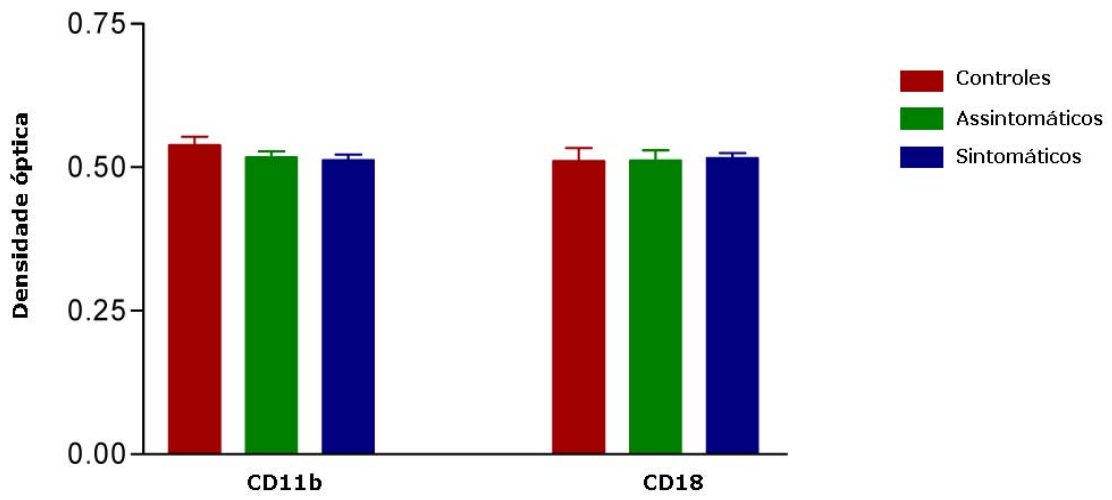
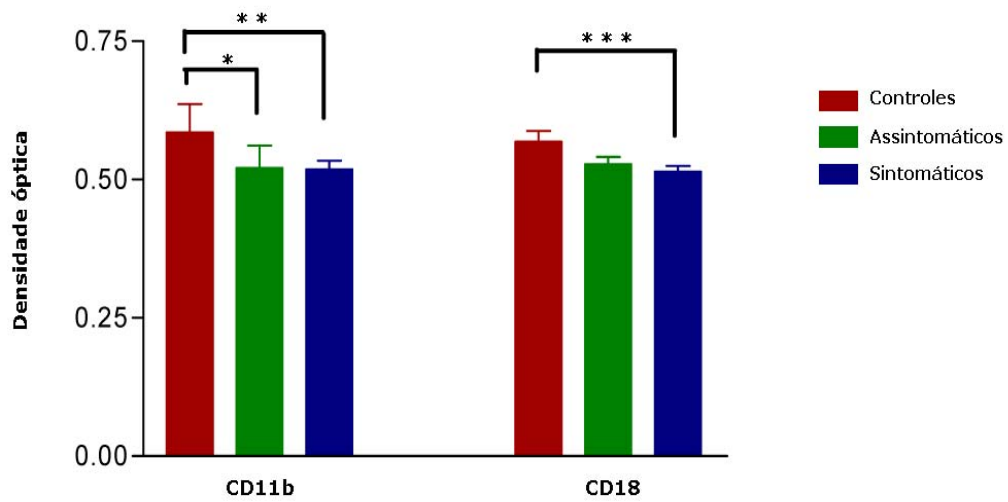
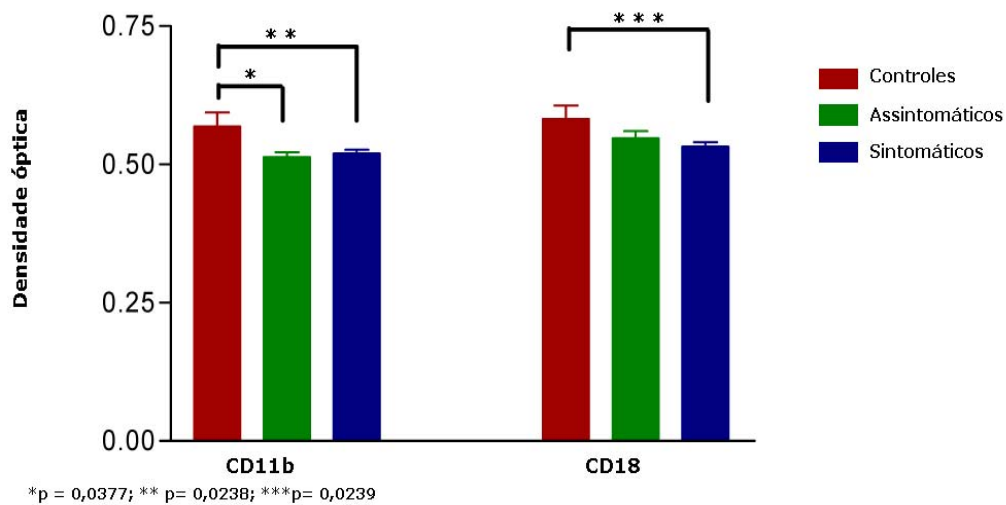


Gráfico 14 – Expressão celular densitométrica CD11b e CD18 no linfonodo cervical de animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.



*p = 0,0068; ** p= 0,0133; ***p= 0,0160

Gráfico 15 – Expressão celular densitométrica CD11b e CD18 no linfonodo poplíteo de animais controle e naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.



A expressão densitométrica tecidual não se mostrou diferente entre os grupos clínicos de animais infectados em nenhum dos linfonodos estudados. Porém esta expressão foi maior em animais infectados quando comparada a animais controle para a proteína CD11b e CD18 nos linfonodos cervicais ($p=0.0032$ e 0.0209 ; teste-T) e poplíteos ($p=0.0042$ e 0.0095 ; teste-T).

4.7 – Análises de correlação

No baço uma correlação positiva entre o parasitismo tecidual e o número de células expressando a proteína CD11b (0.0412), bem como uma correlação positiva entre o parasitismo avaliado pela técnica da imuno-histoquímica e a expressão de CD18 (0,0318). No fígado observou-se uma correlação negativa entre o número de células expressando CD11b (0,0380) ou CD18 (0,0256) e o parasitismo no parênquima hepático também avaliado pela técnica da imuno-histoquímica. No linfonodo cervical as correlações foram positivas, porém não estatisticamente significativas, entre o número de células positivas para a proteína CD11b. Todas as correlações citadas foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de *Pearson*.

O parasitismo dos órgãos estudados para os animais assintomáticos de maneira no conjunto de todos os órgãos mostrou o seguinte: três animais (30%) que não apresentaram parasitismo tecidual em nenhum dos órgãos estudados após análise

das duas técnicas aplicadas (LDU e imuno-histoquímica) e no grupo dos animais sintomáticos apenas um (5%) mostrou o mesmo quadro. Animal assintomático algum apresentou positividade em todos os órgãos estudados, o que ocorreu em dois animais sintomáticos (10%).

De acordo com análises da Matriz de Correlação de Spearman combinada para todos os órgãos estudados a presença do parasito mostrou algumas correlações. Parasitismo no linfonodo axilar determina, de maneira significativa, a presença de parasitos em todos os órgãos (coeficiente de significância $< 0,005$ na Matriz de Correlação de Spearman). Parasitismo em qualquer uma das diferentes regiões anatômicas da pele determina, de maneira significativa, a presença em outra região da pele.

5.0 – DISCUSSÃO

A Leishmaniose visceral canina é uma doença de caráter crônico e de grande importância epidemiológica, sendo o cão o principal reservatório urbano do parasito (Lainsin e Shaw, 1978; Gramaldi *et al.*, 1989; Marzochi *et al.*, 1994; Ashford, 2000). Atualmente, estudos relacionados à patogênese da doença canina têm se mostrado importantes para se esclarecer melhor os mecanismos envolvidos na formação dos sinais e sintomas clínicos apresentados pelos animais infectados (Chagas, 1938; Deane e Deane, 1955; Ciaramella *et al.*, 1997; França-Silva *et al.*, 2002; Alves e Bevilacqua, 2004; Palatinik *et al.*, 2004; Guianetti, *et al.*, 2006)

Alguns aspectos da interação parasito-hospedeiro nas leishmanioses têm permitido esclarecer o papel biológico de proteínas celulares envolvidas como receptores tanto na membrana do parasito quanto nas células do hospedeiro. Rosenthal *et al.*, (1996) avaliaram a expressão das integrinas de membrana CD11b/CD18 (CR3) como marcador fenotípico da interação *Leishmania*-macrófago, *in vitro*, em células humanas, mostrando a importância dessas moléculas na expressão da doença. Os receptores para complemento, principalmente CR3, são reconhecidos como de fundamental importância na interação de parasitos do gênero *Leishmania* e das células dos hospedeiros vertebrados. Talamas-Rohana *et al.*, (1990) apontam o CR3 como receptor potencializador da internalização de formas promastigotas do parasito. Mosser & Edelson (1987); Mosser *et al.*, (1992); Rosenthal *et al.*, (1996) e Kane & Mosser (2000) afirmam que o CR3 é a principal via de internalização do parasito nos monócitos-macrófagos dos hospedeiros vertebrados.

Neste trabalho, o padrão de marcação celular, para ambas as subunidades α e β do receptor do tipo 3 do complemento, foi semelhante, em quase todos os órgãos estudados e notadamente positivo na superfície celular. Houve aumento significativo do número de células entre animais infectados e, em algumas situações, nos animais sintomáticos quando comparados aos assintomáticos. A maior expressão de CR3 em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* foi demonstrada qualitativamente no baço de animais naturalmente e experimentalmente infectados com *L. chagasi* (Tafari *et al.*, 1996). Trabalhos mais recentes, também utilizando animais naturalmente infectados com *L. chagasi*, como os de Sanchez *et al.*, (2004), na Venezuela e Gonçalves *et al.*, (2005) no Brasil, demonstraram através do emprego das técnicas de citometria de fluxo, têm demonstrado a expressão desses receptores de forma mais

precisa do ponto de vista quantitativo. Sanchez et al.,(2004) demonstraram marcação em macrófagos caninos *in vitro* isolados do fígado e baço de cães infectados. Os autores discutem a importância da presença das células CR3 positivas nos diferentes órgãos, onde estariam ligadas diretamente a uma resposta imune celular efetiva. Por outro lado, Gonçalves *et al.*, (2005) utilizando macrófagos peritoniais caninos e formas promastigotas marcadas com fluorocromos, demonstraram que CR3 potencializa a entrada de formas promastigotas nos macrófagos na presença de soro imune. Assim, como outros trabalhos na literatura, esses autores discutem que o afluxo de monócitos e macrófagos, CR3 positivos, aos órgãos alvo, ocorreria primariamente porque as moléculas de CR3, são antes de tudo, integrinas responsáveis pela adesão dos leucócitos às células endoteliais (diapedese) no processo inflamatório. Portanto, o aumento da expressão desses receptores seria responsável pelo afluxo das células, mas ao mesmo tempo facilitador da entrada e sobrevivência de *Leishmania* no interior das células do hospedeiro vertebrado.

Observamos maior expressão de CR3 nos diversos órgãos estudados dos cães naturalmente infectados. A expressão de CR3 não só pode ser medida pelo maior número de células encontradas nos órgãos dos animais acometidos, como também pela maior expressão desses receptores em cada célula individualizada, como acessado em sua expressão densitométrica. Foi encontrada correlação positiva entre a expressão de CR3 e a presença do parasito no baço e no linfonodo cervical e, por outro lado, correlação inversa no parênquima hepático, indicando que a expressão dessas integrinas pode determinar comportamentos diferenciados, influenciados provavelmente de maneira regionalizada em cada órgão (esses resultados foram amplamente discutidos e podem ser lidos no manuscrito aceito para publicação em anexo - anexo 02).

Sanchez *et al.*, (2004) observaram uma resposta inflamatória distinta entre cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados com *L. chagasi*. O fígado de animais assintomáticos apresentou uma resposta imune-inflamatória efetiva com formação de granulomas bem organizados com participação de células efetoras expressando CD44lo, CD45ROhi, CD44hi, CD45ROhi, MHC classe II, CD11c e CD18. No fígado dos animais sintomáticos ocorreu a formação de granulomas desorganizados compostos preferencialmente por células de Kupffer altamente parasitadas e com diminuída expressão das moléculas de ativação citadas. Sanchez *et al.*, (2004) comprovam que há uma reação imune órgão específica na leishmaniose visceral canina. Esses autores, verificaram ainda que no baço dos animais infectados,

em geral, a resposta imune-inflamatória não é claramente definida. Não houve marcações celulares que comprovassem esse tipo de resposta. Além disso, animais assintomáticos não demonstram eliminação da carga parasitária no baço como o observado no fígado.

A idéia de uma resposta imunológica compartimentalizada na leishmaniose, é também demonstrada no modelo murino. Engwerda & Kaye (2000) e Engwerda *et al.*, (2004) apresentam o modelo experimental murino infectado com *L. donovani* e *L. infantum* como um representante significativo da especificidade da resposta imunológica em diferentes órgãos. Para os autores, camundongos infectados com *L. donovani* apresentam no fígado intensa proliferação de formas amastigotas nos momentos iniciais da infecção, porém com evolução para o controle da doença que ocorre em cerca de 30 dias. Ao contrário, o baço apresenta uma fase aguda inicial caracterizada pela ausência da proliferação de formas amastigotas de *Leishmania*. Embora com desenvolvimento de esplenomegalia e persistência tecidual do parasito. Assim, o fígado apresentaria resposta imune do tipo Th1, caracterizada por aumento da atividade de células T e concomitante resposta inflamatória eficaz para o controle e resolução da doença visceral. Em artigo de revisão, Teixeira *et al.*, (2006) discutem que isso ocorreria devido à estimulação provida pelas células T que manteriam uma alta expressão de CXCL10 que em fases tardias da doença são essenciais para a formação dos granulomas. Além disso, monócitos atraídos por MIP-1 alfa e CCL2 (quimiocina MCP-1), seguindo pela estimulação de INF-gamma, poderia ser a fonte de mobilização de quimiocinas dessa resposta. No baço, diferentemente, células estimuladas pela infecção produziram citocinas estimulatórias das repostas Th1 e Th2, com predominância da resposta Th2. O órgão apresentaria uma expressão maior de CCL2 quando comparada a CXCL10 e conseqüentemente maior afluxo de macrófagos para região. Os autores admitem que, baseado nas características locais de sua resposta, o fígado controla a infecção e o baço a mantém.

No modelo experimental da leishmaniose visceral causada por *L. infantum* (sin. *L. chagasi*), trabalhos como os de, Leclercq *et al.*, (1993), Wilson *et al.*, (1996) e Rousseau *et al.*, (2001), apontam à infecção hepática com capacidade de auto-resolução como sendo um bom exemplo de uma resposta imunológica granulomatosa, onde ocorre predomínio de células mononucleares, envolvendo células de Kupffer residentes, macrófagos não residentes e células T CD4 e CD8 positivas. Neste órgão, muitas das interações celulares e moleculares que determinam a capacidade do hospedeiro em eliminar o parasito, têm como requisito a formação dos granulomas

(Sheffield, 1990; Myrray e Nathan, 1999; Hernandez-Pando *et al.*, 2000 e Kaye *et al.*, 2004). Trabalhos de Cervia (1993) e Murray (1994 e 2001) discutem o papel efetor de monócitos e macrófagos como primordial na defesa efetiva do hospedeiro na leishmaniose visceral experimental. Interessantemente, por outro lado, Murray (1994) e Tafuri *et al.*, (2000), mostram que as mesmas células podem servir como fonte de perpetuação do parasito na leishmaniose experimental cutânea.

Considerando que animais sintomáticos mostraram expressão aumentada de proteínas CD11b e CD18 (CR3) no baço e nos linfonodos cervicais, correlação positiva com o parasitismo tecidual destes órgãos, acreditamos, macrófagos seriam mais uma fonte de perpetuação da infecção causada por *L. chagasi*. Todos estes dados foram amplamente discutidos em anexo (Anexo 02).

Um amplo espectro de lesões e alterações histopatológicas podem ser observados durante a infecção pela *L. chagasi* no cão. Nos animais aqui estudados as alterações associadas à pele, como descritas na literatura, foram amplamente encontradas, destacando-se a descamação seca (40,7%) e a alopecia (40,7%). Além disso, quando consideramos as alterações da pele em conjunto (descamação, alopecia, seborréia e ulcerações), essas passam a ser predominantes entre todas as lesões, o que está de acordo com o descrito por Ciaramella *et al.*, (1997); Ferrer *et al.*, (1999), Lima *et al.*, (2004) (anexo 03) e Guinchetti *et al.*, (2006). A dermatite esfoliativa estava associada à formação de caspas de coloração brancacenta acometendo principalmente a região das orelhas, cabeça e extremidades. Nesses casos a alopecia foi um achado sempre associado. Estes dados foram amplamente discutidos por Lima *et al.*, (2004) em anexo (Anexo 03).

A quarentena submetida aos animais não gerou melhora clínica significativa. Na maioria dos casos, os animais mantiveram as mesmas condições clínicas apresentadas antes da quarentena e alguns deles desenvolveram piora do quadro clínico. Do ponto de vista clínico, aparentemente houve diminuição da anemia clínica (29,6%) devido à melhora das condições nutricionais, visto que, após a quarentena o número de cães com ganho de peso diminuiu.

Os achados microscópicos para todos os órgãos foram os mesmos já descritos, sem alterações histológicas dignas de nota. No baço a congestão, observada a macroscopia pela coloração e a fluidez de sangue ao corte do órgão, foi freqüente. Ao

contrário dos resultados descritos por Tafuri *et al.*, (2001), onde foram baixos os índices de espessamento da cápsula, bem como a inflamação capsular e subcapsular esplênicas. Ainda no baço, a hipertrofia e hiperplasia da polpa branca ocorreram em todos os grupos estudados. Estas alterações encontram-se descritas em trabalhos de Veress *et al.*, (1977) para o homem, Tafuri *et al.*, (2001) para animais naturalmente infectados e Tafuri *et al.*, (1996) em animais experimentalmente infectados. Depleção de áreas T dependentes, bainha periarteriolar da polpa branca, no baço de hamsters e cães experimentalmente infectados com *L. donovani* (Corbett...*et al.*, 1992; Keenan *et al.*, 1994), tem sido amplamente descritos na literatura, sendo que esses animais certamente desenvolvem algum grau de imunodepressão. Neste trabalho, essa alteração foi observada em dois animais sintomáticos (10%). Na região de polpa vermelha, grande número de macrófagos parasitados pôde ser observado em animais tanto de perfil sintomático quanto de perfil assintomático. A presença de macrófagos altamente parasitados no parênquima de órgãos linfóides de animais assintomáticos é também descritos por outros autores como Abranches *et al.*, (1998), Natami *et al.*, (2000), Lima *et al.*, (2004) (anexo 03) e Xavier *et al.*, (2006a) (anexo 04). Esses trabalhos discutem a importância do cão assintomático na epidemiologia da doença. Outro fato importante que deve ser considerado é o tempo de infecção dos animais, pois isso não pôde ser determinado nesse trabalho.

No fígado, em geral, observamos a presença da reação inflamatória crônica, caracterizada pela grande presença de infiltrado de células mononucleares nos espaço-porta e no parênquima hepático (lóbulos). O exsudato inflamatório formava arranjos especiais, que são caracterizados por alguns autores como granulomas intralobulares hepáticos. Este achado é descrito em modelos murinos da leishmaniose visceral (Murray *et al.*, 2000), em cães experimentalmente infectados com *L. donovani* e *L. chagasi* (Gonzalez *et al.*, 1988; Oliveira *et al.*, 1993; Tafuri *et al.*, 1996), em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* (Tafuri *et al.*, 1996 e Sanchez *et al.*, 2004), bem como na doença humana por El Hag *et al.*, (1994).

Nos linfonodos axilares, cervicais e poplíteos, todos os achados histopatológicos encontrados estão em acordo com os já descritos na literatura por Tafuri (1995) e Lima *et al.*, (2004) (anexo 3), porém com maior envolvimento dos processos de congestão e hemossiderose. Na cápsula o desarranjo estrutural com neoformação conjuntiva associada a quadros inflamatórios é descrito não só para cães naturalmente infectados (Alencar, 1959) como para animais experimentalmente infectados (Tafuri *et*

al., 1995). Alterações inflamatórias no seio subcapsular e a hipertrofia e hiperplasia de macrófagos foram às alterações mais frequentes, assim como os descritos por Lima *et al.*, (2004) (anexo 3) considerando-se os linfonodos cervicais, poplíteos e axilares. Inclusive, na região medular dos linfonodos estudados, essa última alteração determinou o espessamento dos seios e cordões da região medular. Não raro, principalmente nos linfonodos cervicais foi encontrada a presença de líquido de edema, o que comprovou o achado macroscópico. No cordão medular houve predominância de plasmócitos às vezes com formação de corpúsculos de Rusell. Todos esses achados são descritos também por Tafuri (1995), Martinez-Moreno *et al.*, (1993) e Lima *et al.*, (2004) (anexo 3).

A ausência de reatividade, do ponto de vista histológico, dos linfonodos foi representada pela ausência da hipertrofia e hiperplasia dos nódulos e folículos linfóides. Assim, isso foi observado em linfonodos tanto de animais sintomáticos quanto em animais assintomáticos. Este fato tem sido descrito na literatura no cão naturalmente infectado por *L. chagasi* como os trabalhos de Lima *et al.*, (2004) e Xavier *et al.*, (2006a) (Anexos 03 e 04).

Outra alteração histológica, como a diminuição da população linfocitária associada à proliferação de células plasmáticas e macrófagos agregados (granulomas), parasitados ou não, foi também observado em alguns de nossos casos. Esta alteração se encontra documentada em casos humanos por Melleney (1925) e Veress *et al.*, (1977), para hamsters experimentalmente infectados por Corbett *et al.*, (1992), para cães experimentalmente infectados com *L(L) chagasi* e *L. donovani* por Keenan *et al.*, (1994) e para cães naturalmente infectados com *L. infantum* por Martinez-Moreno *et al.*, (1993).

Na pele as alterações histopatológicas também não foram diferentes entre os grupos de animais infectados estudados. Houve maior frequência de lesões, e mais graves, na pele da orelha. A dermatite crônica, caracterizada por um infiltrado plasmohistio-linfocitário foi observado predominantemente na pele da orelha, o que é citado em trabalhos anteriores como os de Lima *et al.*, (2000), Travi *et al.*, (2001); Giunchetti *et al.*, (2006) e Xavier *et al.*, (2006). Estes autores sugerem uma distribuição desigual do parasitismo da pele (também observado nesse estudo) com índices maiores para a orelha quando comparados à pele do espelho nasal e à pele do abdômen. O maior parasitismo na pele da orelha estaria associado não só ao fato da orelha ser o alvo mais frequente da picada do inseto, mas por áreas alvo de injúrias como picadas de

insetos, por exemplo, levando ao prurido regional e a auto-traumatismos. Como conseqüência haveria uma maior migração de células inflamatórias (monócitos-macrófagos) para a região como apontado por Murray *et al.*, (1982); Tafuri *et al.*, (2000) e Xavier (2002).

As lesões de pele são epidemiologicamente um fator clínico de grande importância (Marzochi *et al.*, 1985; Ciaramella *et al.*, 1997), pois chamam a atenção e facilitam a identificação de animais doentes. Porém, animais assintomáticos apresentam um parasitismo não diferente de animais que apresentam essas lesões, tornando os cães assintomáticos potencialmente transmissores “ocultos” (Abranches *et al.*, 1998; Solano Galeno *et al.*, 2004).

O parasitismo encontrado em nossos animais avaliado pela técnica da LDU não revelou diferenças entre os grupos clínicos de animais naturalmente infectados em nenhum dos órgãos submetidos a essa técnica. Por outro lado, o parasitismo avaliado pela técnica da imuno-histoquímica permitiu avaliações mais precisas e obtenção de uma melhor confirmação da positividade. Trabalhos têm revelado a maior sensibilidade da técnica da imuno-histoquímica para detecção do parasitismo tecidual por formas amastigotas de *Leishmania*. Xavier *et al.*, (2006) apontam maior eficiência dessa técnica destacando sua maior sensibilidade para a identificação de casos positivos da doença visceral. Giunchetti *et al.*, (2006), apresenta em estudo com pele de animais naturalmente infectados, maior positividade encontrada por essa técnica em animais naturalmente infectados de grupos clínicos sintomáticos, oligossintomáticos e assintomáticos que os encontrados pela técnica da LDU. No baço, como já comentado anteriormente nesta seção, houve um maior parasitismo tecidual nos animais sintomáticos, o que é um achado também descrito por Sanchez *et al.*, (2004) em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* na Venezuela. Porém, no fígado, não houve diferença estatística do parasitismo entre os animais assintomáticos e sintomáticos em áreas parenquimatosas. Nos linfonodos também não observamos diferenças entre o parasitismo de animais infectados assintomáticos e sintomáticos. Lima *et al.*, (2004) avaliaram o parasitismo tecidual dos mesmos linfonodos pela técnica da LDU encontrando resultados semelhantes. Entretanto, Lima *et al.*, (2004) (anexo 3) discutem a importância do linfonodo cervical na leishmaniose visceral canina, tanto pelo maior parasitismo nele encontrado, quanto por ele apresentar quadros histopatológicos mais intensos que os outros linfonodos. Nossos

dados também apontam maior parasitismo tecidual, independentes ao grupo clínico, para esse linfonodo.

Na pele a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos clínicos estudados foi um dado também apontado por Xavier *et al.*, (2006), mas discordam dos achados de Giunchetti *et al.*, (2006), que apontam maior parasitismo na pele de orelha de animais sintomáticos quando comparados a animais assintomáticos. De qualquer forma, considerando todos esses resultados podemos dizer que a pele da orelha é a mais importante região anatômica do cão como reservatório do parasito com grande importância epidemiológica para a doença humana.

Ainda deve-se ressaltar que animais assintomáticos, em sua grande maioria, apresentaram parasitismo tecidual em pelo menos um dos órgãos estudados, enquanto que animais sintomáticos, embora em baixa frequência, apresentaram ausência de parasitismo em todos os tecidos estudados. Então, avaliando-se em conjunto os dados encontrados para presença de parasitos nos diferentes tecidos considerados, e as alterações histopatológicas neles encontrados, podemos inferir que, na leishmaniose visceral canina, a sintomatologia não é diretamente influenciada somente pela intensidade do parasitismo tecidual e a gravidade das lesões anátomo-patológicas, mas também associado a fatores característicos individuais do hospedeiro e nas interações ocorridas entre os parasitos e as células do hospedeiro determinantes no desenvolvimento de sua resposta imune.

6.0 – CONCLUSÕES

- Animais naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* apresentam maior expressão tecidual de receptores do complemento do tipo 3 (CR3).
- Células do fígado, baço e linfonodos de animais naturalmente infectados por *L. chagasi* têm maior expressão em suas membranas das proteínas componentes CD11b e CD18, componentes do receptor para complemento do tipo 3 (CR3).
- A maior expressão de CR3 no fígado e baço de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* associado ao diferente quadro do parasitismo tecidual nestes órgãos, pode sugerir uma resposta imune órgão-específica.
- As alterações clínicas observadas em animais infectados nem sempre estão associadas à presença do parasito.
- As alterações histológicas encontradas no baço, fígado, linfonodos e peles de animais infectados não se diferem em animais que apresentam alterações clínicas e aqueles que não as apresentam.
- O baço, fígado, linfonodos e peles não apresentam alterações histológicas fundamentais que distinguem animais assintomáticos de sintomáticos.
- A exceção do baço, o parasitismo tecidual é diferente entre animais assintomáticos e sintomáticos na leishmaniose visceral.
- Raros são os casos de animais infectados que apresentam ausência do parasito em todos os órgão avaliados (mesmo em animais assintomáticos). Em contrapartida, raros são os casos em que esses animais apresentam positividade em todos os órgãos.
- A presença do parasito no linfonodo a axilar se correlacionou positivamente com a presença em todos os órgãos.

7.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches, P., L. Campinho, *et al.* Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. Acta Médica Portuguesa, v.11, p.871-875. 1998.

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

Alencar, J. E. Calazar canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia no Brasil. (Doutorado). Imprensa OficialCeará, 1959. 342 p.

Alexander, J., A. R. Satoskar, *et al.* Leishmania species: models of intracellular parasitism. J. Cell. Sci, v.112, p.2993-3002. 1999.

Alves, W. A. e P. D. Bevilacqua. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, MG, Brazil, 1993-1997. Cad Saude Publica, v.20, n.1, p.259-265. 2004.

Alvar, J., C. Canavate, *et al.* Canine leishmaniasis. Adv Parasitol, v.57, p.1-88. 2004.

Ashford, D. A., J. R. David, *et al.* Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg, v.59, n.1, Jul, p.53-7. 1998.

Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int.J.Parasitol., v.30, n.12-13, 11/2000, p.1269-1281. 2000.

Bogliolo, L. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência a fibrose hepática leishmaniótica. O Hospital, v. 3, p.101. 1956.

Blackwell, J. M. Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. Trans R Soc Trop Med Hyg., v.79, n.5, p.606-612. 1985.

Brener, Z. Calazar canino em Minas Gerais. (Doutorado). Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, 1957. 90 p.

Caliari, M. V. Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes. Belo Horizonte: Editora da UFMG. 1997. 148 p.

Caliari, M. V., M. Lana, *et al.* Expression of caCD44, caCD45RA and caMHCII in acute and chronic canine cardiomyopathy: standardization through KS300 macro assemble. Braz. J. Investig. Morphol Morphom, v.1, n.1, p.15-23. 2006.

Cervia, J. S., H. Rosen, *et al.* Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. Infect Immun, v.61, n.4, Apr, p.1330-3. 1993.

Chagas, E., A. M. Cunha, *et al.* Leishmaniose visceral americana. Relatório dos trabalhos da Comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral Americana em 1937. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio, v.33, p.89. 1938.

- Chang, K. P. *Leishmania donovani*: Promastigote -macrophage surface interactions in vitro. Exp. Parasitol, v.48, p.175-189. 1979.
- Chung, H. L., R. Hoeppli, *et al.* Histopatological observatins in twelve cases of canine leishmaniasis in Peiping. Chin. Med. J, v.3, n.212-223. 1940.
- 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, 11/22/1997, p.539-543. 1997.
- Corbett, C. E., R. A. Paes, *et al.* Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. Int.J.Exp.Pathol., v.73, n.4, 8/1992, p.417-433. 1992.
- Cunningham, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Exp.Mol.Pathol., v.72, n.2, 4/2002, p.132-141. 2002.
- Deane, L. M. e M. P. Deane. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. O Hospital, v.47, . p.75. 1955.
- _____. Visceral Leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. Rev Inst. Med. trop, v. 4, p.198. 1962.
- Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis, v.27, p.305-318. 2004.
- Dias, D. V., C. A. Costa, *et al.* Leishmaniose visceral canina - Estudo parasitológico e histológico em olhos de cães - Parte I. Rev. Bras. Ofta, v.58, p.331-337. 1999.
- Donatien, A. e F. Lestquard. Notes sur la leishmaniose viscerale canine. Bull. Soc. Path. Exot, v.28, p.426-431. 1935.
- Duarte, M. I. S., M. D. Laurenti, *et al.* Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop, v.28, p.431-436. 1986.
- Ember, J. A. e T. E. Hugli. Complement factors and their receptors. Immunopharmacology, v.38, n.1-2, 12/1997, p.3-15. 1997.
- Engwerda, C. R. e P. M. Kaye. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. Immunol.Today, v.21, n.2, 2/2000, p.73-78. 2000.
- Engwerda, C. R., A. Manabu, *et al.* Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Trends Parasitol, v.20, n.11, p.524-530. 2004.
- Ferrer, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Spain. 1999, 1999. 06-10 p.
- Fondevila, D., M. Vilafranca, *et al.* Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. Vet.Immunol.Immunopathol., v.56, n.3-4, 5/1997, p.319-327. 1997.
- Franca-Silva, J. C., R. T. Da Costa, *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Vet Parasitol, v.111, n.2-3, Feb 13, p.161-73. 2003.
- Genaro, O. Leishmaniose Visceral canina experimental. (Doutorado em Parasitologia). Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 1993. 202 p.

- 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, p.*In press*. 2006.
- Goncalves, R., W. L. Tafuri, *et al.* Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.45, n.3, May-Jun, p.153-8. 2003.
- Goncalves, R., E. R. Vieira, *et al.* A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. BMC Infect Dis, v.5, n.1, May 24, p.39. 2005.
- Grimaldi, G., R. B. Tesh, *et al.* A review of the geografic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the New World. Am. J. Trop. Med Hyg, v.41, p.687. 1989.
- Grimaldi Jr, G. e R. B. Tesh. Leishmanioses of the New World: Current concepts and implications for future research. Clin. Microbiol. Rev, v. 6, . p.230-250. 1993.
- Guy, R. e M. Bolosevic. Coparasion of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. Infection and Immunity, v.6, n.4, p.1553-1558. 1993.
- Hall, B. F. e K. A. Joiner. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. Imunoparasitol. Today, v.12, p.A22-A27. 1991.
- Handman, E. e D. V. Bullen. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol, v.18, n.8, Aug, p.332-4. 2002.
- Herwaldt, B. L. Leishmaniasis. Lancet, v.354, n.9185, 10/2/1999, p.1191-1199. 1999.
- Iturry-Yamamoto, G. R. e C. P. Portinho. Complement system: activation, regulation and congenita and acquired deficiency. Rev.Assoc.Med.Bras., v.47, n.1, 1/2001, p.41-51. 2001.
- Iversson, L., M. Camargo, *et al.* Serological survey for research on visceral leishmaniasis in an urban dog population of the municipality of Sao Paulo, Brazil (1979-1982). Rev Inst Med Trop Sao Paulo., v.25, n.6, p.310-7. 1983.
- Jenefer, M., R. Blackwell, *et al.* Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. J. Exp. Med, v.162, p.324-331. 1985.
- Kane, M. M. e D. M. Mosser. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. Curr.Opin.Hematol., v.7, n.1, 1/2000, p.26-31. 2000.
- Keenan, C. M., Hendricks L.D., *et al.* Visceral leishmaniasis in a german sheeperdog. I. infeccion, clinical disease, and clinical pathology. Vet. Pathology, v.2, p.74-79. 1984.
- Killick-Kendrick, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. Ann. Parasitol. Hum. Comp, v.65, p.37-42. 1979.
- Lainson, R. e J. J. Shaw. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin American. Nature, v.273, n.1, p.595. 1978.
- Lambaris, J. D. The multifunctional role of C3, the third component of complement. Immunol. Today, v.9, p.387-393. 1988.

Lanothe, J. Essai de traitement de la leishmaniose canine par l'amphotericine B: 39 cas. Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie, v.32,, p.133-141,, 1997.

Leclercq, V., B. F. Hall, *et al.* The outcome of the parasite initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. J. Immunol, v.156, n.1, p.4537-4545. 1996.

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

Martinez-Moreno, A., M. S. Martinez-Cruz, *et al.* Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol, v.51, n.1-2, Dec, p.49-59. 1993.

Marzochi, M. C. A., S. G. Coutinho, *et al.* Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil, clinical, parasitological, therapeutic and epidemiological findings (1977-1983). Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio, v.80, n.3, p.349-357. 1985.

Marzochi, M. C. A. e K. B. F. Marzochi. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - emerging zoonosis and possibilities for their control. Cad.Saude Publica, v.10, n.2, 1994, p.359-375. 1994.

Mauricio, I. L., J. R. Stothard, *et al.* The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today, v.16, n.5, May, p.188-9. 2000.

Meleney, H. E. The histopathology of Kala-Azar in the hamster, monkey and Man. J. Pathology, v.1, p.147-167. 1925.

Michalick, M. S. M. Spreading of visceral Leishmaniasis in urban area of Belo Horizonte, MG, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio, v.88, n.53. 1993.

Mosser, D. M. Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition. In: B. S. Zwillig e T. K. Eisenstein (Ed.). Macrophage-pathogen interactions. New York: Marcel Dekker Inc., v.1, 1993. Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition, p.99-114

Mosser, D. M. e L. A. Brittingham. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. Semin Cell Biol, v.4, n.5, p.9-23. 1997.

Mosser, D. M. e P. J. Edelson. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. J. immunol, v.135, p.2785-2789. 1985.

_____. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. J. immunol, v.135, p.2785-2789. 1986.

_____. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. Nature, v.327, n.6120, 5/28/1987, p.329-331. 1987.

Mosser, D. M. e E. Handman. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind *Leishmania* promastigotes. J Leukoc Biol, v.52, n.4, Oct, p.369-76. 1992.

Mosser, D. M. e L. A. Rosenthal. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. Semin Cell Biol, v.4, n.5, Oct, p.315-22. 1993.

Murray, H. W. Blood monocytes: Differing effector role in experimental visceral versus cutaneous leishmaniasis. Parasitol Today, v.10, n.6, p.220-3. 1994.

_____. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. Int J Exp Pathol, v.82, n.5, Oct, p.249-67. 2001.

Murray, H. W., H. Mansur, *et al.* Cell mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. correlation between resistance to *L. donovani* and lymphokine generation capacity. J. Immunol., v.13, p.1487-1491. 1982.

Natami, A., H. Sahibi, *et al.* Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. Vet Res, v.31, n.3, May-Jun, p.355-63. 2000.

Palatnik, M. e C. C. Lavor. Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. An Acad Bras Cienc, v.76, n.3, p.583-593. 2004.

Pearson, R. D. e R. T. Steigbigel. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. J. Immunol., v.125, p.2195-2199. 1980.

Puentes, S. M., D. M. Dwyer, *et al.* Binding and release of C3 from *L. donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. J. Immunol, v.143, p.3743-3749. 1989.

Reithinger, R. e C. R. Davies. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. The 2nd International Forum on Canine Leishmaniasis was held in Seville. Spain: Trends in Parasitology, 2002. 289-290 p.

Rosenthal, L. A., F. S. Sutterwala, *et al.* *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. Infect.Immun., v.64, n.6, 6/1996, p.2206-2215. 1996.

Ross, G. D. e M. E. Medof. Membrane complement receptors specific for bound fragments of C3. Adv. Immunol, v.37, p.217-267. 1985.

Ross, R. Note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies. . Brit. Med. J, v.2, p.1261-1401. 1906.

Rosseau, D., R. L. Jacobson, *et al.* Sustained parasitic burden in the spleens of *Leishmania infantum*-infected Balb/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcript and lack of protection against challenge. Eur Cytokine Netw, v.12, n.1, p.340-347. 2001.

Russel, D. G. e S. D. Wright. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. J. Exp. Med, n.168, p.279-292. 1988.

Russell, D. G. e P. Talamas-Rohana. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. Immunol.Today, v.10, n.10, 10/1989, p.328-333. 1989.

Sacks, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp.Parasitol., v.69, n.1, 7/1989, p.100-103. 1989.

Saliba, E. K. e O. Y. Oumeish. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. Clin.Dermatol., v.17, n.3, 5/1999, p.275-277. 1999.

Sanchez, M. A., N. L. Diaz, *et al.* Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg, v.70, n.6, Jun, p.618-24. 2004.

Schlein, Y., R. L. Jacobson, *et al.* *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., v.89, n.20, 10/15/1992, p.9944-9948. 1993.

Sheffield, E. A. The granulomatus inflammatory response. J Pathol, v.160, n.1, p.1-2. 1990.

Silva, F. L., W. L. Tafuri, *et al.* Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, v.54, n.4, p.340-344. 2002.

Sim, R. B., V. Malhotra, *et al.* Structure and specificity of complement receptors. Immunol.Lett., v.14, n.3, 2/1987, p.183-190. 1987.

Slappendel, R. J. e C. E. Grene. Leishmaniasis. In: Infectious diseases of the dog and cat. In: C. Greene (Ed.). Philadelphia, PA: WB Saunders Co, 1990. . p.769-777

Solano-Gallego, L., H. Fernandez-Bellon, *et al.* Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. J Comp Pathol, v.130, n.1, Jan, p.7-12. 2004.

Stauber, L. A. Host resistance to the Kharthoum strain of *Leishmania donovani*. . The Rice Institute Pamphlet, v.45, p.80-96. 1956.

Tafuri, W. L. Leishmaniose visceral em cães natural e experimentalmente infectados: histopatologia e estudo imunocitoquímico dos receptores do tipo 3 (CR3 - CD11b/CD18) e 4 (CD11c/CD18) do complemento e dos antígenos de histocompatibilidade da classe II no fígado e órgãos linfóides. (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995. 207 p.

Tafuri, W. L., A. J. Barbosa, *et al.* Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.38, n.2, Mar-Apr, p.81-9. 1996.

Tafuri, W. L., M. R. De Oliveira, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Vet.Parasitol., v.96, n.3, 4/2/2001, p.203-212. 2001.

Tafuri, W. L., M. S. Michalick, *et al.* [Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.31, n.3, May-Jun, p.139-45. 1989.

- Tafari, W. L., L. Santos Rd Rde, *et al.* An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J Immunol Methods, v.292, n.1-2, Sep, p.17-23. 2004.
- Talomas-Rohana, P., S. D. Wright, *et al.* Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leucocyte integrins. J. Immunol., v.144, n.4817-4824. 1990.
- Teixeira, M. J., C. R. Teixeira, *et al.* Chemokines in host-parasite interaction in leishmaniasis. Trends Parasitol, v.22, n.1, p.32-40. 2006.
- Tesh, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? Am.J.Trop.Med.Hyg., v.52, n.3, 3/1995, p.287-292. 1995.
- Travi, B. L., C. J. Tabares, *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. Am J Trop Med Hyg, v.64, n.3-4, Mar-Apr, p.119-24. 2001.
- Tryphonas, L., Z. Zawidzka, *et al.* Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. Can. J. Comp.Med, v.41, p.1-2. 1977.
- Veress, B., A. Omer, *et al.* Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. Immunology, v.33, n.5, 11/1977, p.607-610. 1977.
- Wilson, M. E., C. A. Da Costa, *et al.* Local suppression of INF=gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi* J. Immunol, v.156, n.1, p.2231-2239. 1996.
- Wilson, M. E. e R. D. Pearson. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human monocelular phagocytes. Infect.Immun, v.56, p.363-369. 1988.
- Wyler, D. J., J. P. Syper, *et al.* In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. I. Infect. Immun, v.49, p.305-311. 1985.
- Xavier, S. C. Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (Dissertação de Mestrado). UFMG, Belo Horizonte, 2002. 46 p.
- Xavier, S. C., I. M. Chiarelli, *et al.* Canine visceral leishmaiasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootev, v.12, n.3, p.994-1000. 2006.

ANEXOS



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology 117 (2007) 129–136

Veterinary
immunology
and
immunopathology

www.elsevier.com/locate/vetimm

Short communication

Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*

W.G. Lima¹, P.S. Oliveira¹, M.V. Caliari, R. Gonçalves, M.S.M. Michalick, M.N. Melo, W.L. Tafuri, W.L. Tafuri*

Departamento de Patologia Geral (ICB-UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP 31270901, Brazil

Received 4 October 2006; received in revised form 5 December 2006; accepted 19 February 2007

Abstract

Leishmania promastigotes interact with macrophages through the association of multiple membrane surface receptors. Macrophage complement receptor CR3 (CD11b/CD18 or Mac-1) has been implicated in the interaction of both human and murine macrophages with serum-opsonized promastigotes. The aim of this study was to determine CR3 expression in the livers and spleens of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

CR3 expression in liver was higher in asymptomatic than in symptomatic animals. Moreover, the hepatic parasitism load determined by immunocytochemical analysis was lower in parallel with higher numbers of granulomas. In contrast, in spleens, CR3 expression was higher in symptomatic animals than in asymptomatic ones. However, the tissue parasite load was greater in spleens of symptomatic dogs. There was a strict correlation between the parasite load and cellular CR3 expression in the spleens of dogs naturally infected with *L. chagasi*.

CR3 macrophage integrins could be essential receptors for *Leishmania* survival. Considering that the symptomatic animals showed higher parasite loads and higher CD11b/CD18 expression in their spleens, we can conclude that these splenic cells (monocyte-macrophages) might serve to perpetuate intracellular infection.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Canine; Visceral leishmaniasis; Spleen; Liver; CR3 (CD11b/CD18) receptors

1. Introduction

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi* in America) (Mauricio et al., 2000) and is transmitted by

phlebotomine sand fly bites (*Lutzomyia longipalpis* species in America). The extracellular flagellate promastigote form of *Leishmania* binds to specific receptors on macrophages and is internalized by receptor-mediated phagocytosis (Mosser and Rosenthal, 1993). This initial promastigote–macrophage interaction is crucial for the establishment of the infection whereas it is maintained by the intracellular non-flagellate amastigote form of *Leishmania* that reside within mononuclear phagocytes in the mammalian host. Various receptors are involved in these

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3499 2889; fax: +55 31 3499 2889.

E-mail address: wagner@icb.ufmg.br (W.L. Tafuri).

¹ These authors have been equally contributed for this manuscript.

interactions and the integrins CD11b/CD18 (Mac-1 or CR3) have been implicated in *L. major* and murine or human monocyte-macrophage adhesion in *in vitro* assays (Mosser and Edelson, 1985, 1987; Mosser et al., 1992). The best-characterized of these systems is the binding of serum complement opsonized promastigotes to macrophage complement receptors (Mosser and Edelson, 1985; Mosser and Rosenthal, 1993; Kane and Mosser, 2000; Basu and Ray, 2005). The macrophage complement receptor Mac-1 (CD11b/CD18 or CR3), a heterodimeric integrin (CD11b- α v/CD18- β 2) (Hynes, 1992), has been shown to predominate in the complement-dependent internalization of opsonized promastigotes by both human and murine macrophages (Mosser and Edelson, 1985; Mosser et al., 1992; Rosenthal et al., 1996; Handman and Bullen, 2002).

In 1996, our group (Tafuri et al., 1996) characterized CD11b/CD18 (CR3) expression in the livers and spleens of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania chagasi*. However, we did not quantify the molecules in these tissues. In the present study, we have quantified CR3 expression and related it to the tissue parasite load in the livers and spleens of dogs with a defined clinical status of infection. As far as we know, Madeira et al. (1999) were the first to assay binding between different species of *Leishmania* and canine macrophages. Our recent *in vitro* assays using canine peritoneal macrophages and *L. chagasi* promastigotes (Goncalves et al., 2005) has shown a strict interaction between CD11b/CD18 (CR3 or Mac-1) β 2 integrin surface adhesion proteins and promastigotes. However, CD11b/CD18 in target organs *in situ* has not been extensively characterized. In our previous work (Tafuri et al., 1996), we described histopathological changes in the livers and spleens of dogs naturally and experimentally infected with *L. chagasi*, notably increased numbers of CD18 positive cells.

Thus, the aim of the present study was to characterize and quantify CD11b/CD18 expression in the livers and spleens of dogs naturally infected with *L. chagasi* from an endemic area of Brazil. We have compared these immunological findings to some histological and parasitological aspects of the infection in both organs.

2. Methods

2.1. Animals

Seventy-six mongrel dogs of unknown age were identified during an epidemiological survey of canine visceral leishmaniasis carried out by the City Hall

(Zoonosis Department) of Belo Horizonte, MG (Southeast Brazil). For all animals, the following tests were used: indirect immunofluorescence antibody titres (IFAT), complement fixation reaction (CFR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Andrade et al., 2002). Immunofluorescent titres ($>1:40$ dilutions), CFR ($>1:40$ dilutions) and ELISA (optical density >100 ; $>1:400$ dilutions) were considered, respectively. In order to certify about the *L. chagasi* infection, serum obtained from 10 infected animals (a random group) was used for analysis with a commercial kit with an immunochromatographic strip containing recombinant leishmanial antigen k39, a dominant amastigote antigen of *L. chagasi* (rK39), which is highly sensitive and specific for *L. donovani* complex infection, as previously described (Houghton et al., 1988; Burns et al., 1993; Sundar and Rai, 2002).

Animals were divided into two groups: group I consisted of 66 naturally infected animals with *L. chagasi* (44 symptomatic and 22 asymptomatic animals); group II consisted of 10 animals serologically and parasitologically negative for *Leishmania*. All animals were maintained in quarantine with food and water *ad libitum*. The dogs received anti-helminthic and anti-ectoparasitic treatment. The experimental protocol using dogs was approved by CETEA (Comitê de ética em experimentação animal – UFMG).

2.2. Clinical aspects of the infected dogs

All infected dogs were clinically classified according to a previous study (Mancianti et al., 1988; Lima et al., 2004) as follows—(1) Symptomatic dogs: animals that exhibited the classical signs of the disease, such as cutaneous alterations (alopecia, dry exfoliative dermatitis or ulcers), onychogryphosis, keratoconjunctivitis, cachexia and anemia; lymphadenopathy and weight loss and (2) asymptomatic dogs: apparently healthy animals.

2.3. Histopathology

All animals were anesthetized with a dose of 0.5 ml/kg Thiopental[®] i.v. (2.5%) and sacrificed with T61[®] (0.3 ml/kg). Samples of livers and spleens were collected and fixed in 10% neutral buffered formalin. All tissue samples were dehydrated, cleared, embedded in paraffin, cut into sections 4–5 μ m thick and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological (optical microscopy) and immunohistochemical studies.

2.4. Immunocytochemical (ICH) and morphometrical methods for *Leishmania* tissue burden study

For these studies, a control group of non-infected animals (10 animals that were previously described) and a group of 30 naturally infected animals (group I of 66 animals) subdivided into 12 asymptomatic and 18 symptomatic animals were used.

Deparaffinated slides were hydrated and incubated with 4% hydrogen peroxide (30, v/v) in 0.01 M PBS, pH 7.2, followed by incubation with normal goat serum (diluted 1:50). Heterologous immune serum from dogs naturally infected with *L. chagasi* (diluted 1:100 in 0.01 M PBS) was used as the primary antibody “crossreactive as described by Tafuri et al. (2004)”. The slides were incubated for 18–22 h at 4 °C in a humid chamber, washed in PBS, incubated with biotinylated goat anti-mouse and anti-rabbit (Link-DAKO, LSAB2 kit, California, USA), washed once more with PBS and incubated with streptavidin-peroxidase complex (Link-DAKO, LSAB2 kit, California, USA) for 20 min at room temperature. The reaction was developed with 0.024% diaminobenzidine (DAB; Sigma, Saint Louis, USA) and 0.16% hydrogen peroxide (40, v/v). The slides were counterstained with Harris’s hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted with coverslips. Twenty images were randomly chosen and used to count the immunolabeled amastigotes. The images were obtained by software, viewed on a computer video screen and relayed to a computer-assisted image analysis system (Kontron Elektronik/Carl Zeiss, Germany). The *Leishmania* tissue burden was determined from the immunolabeled amastigotes in the paraffinated liver and spleen tissue specimens derived from real images and segmented to produce binary images (Caliari, 1997).

2.5. Immunocytochemical (ICH) and morphometrical methods for studying tissue expression of complement receptor 3 (CD11b/CD18)

For these studies the same group of 30 animals (12 asymptomatic and 18 symptomatic animals) from the 66 animals naturally infected with *L. chagasi* was used.

Frozen liver and spleen sections 2 μm thick were hydrated and incubated in 4% hydrogen peroxide (30, v/v) in 0.01 M PBS, pH 7.2, followed by incubation with normal goat serum (diluted 1:50). Monoclonal anti-canine CD11b (Serotec Ltd., Oxford, UK – diluted 1:100 in 0.01 M PBS) and monoclonal anti-canine

CD18 (Serotec. Ltd., Oxford, UK – diluted 1:100 in 0.01 M PBS) were used as primary antibodies. The slides were incubated for 18–22 h at 4 °C in a humid chamber, washed in PBS, incubated with biotinylated goat anti-mouse and anti-rabbit (Link-DAKO, LSAB2 kit, California, USA), washed in PBS again and incubated with the streptavidin-peroxidase complex (Link-DAKO, LSAB2 kit, California, USA) for 20 min at room temperature. The reaction was developed with 0.024% diaminobenzidine (DAB; Sigma, Saint Louis, USA) and 0.16% hydrogen peroxide (40, v/v). The slides were counterstained with Harris’s hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted with coverslips (Tafuri et al., 1996, 2004). As previously described, 20 images were randomly chosen and digitalized and the number of CD11b and CD18 positive cells was analyzed (Caliari et al., 2002).

2.6. Number and diameter of granulomas in livers of dogs naturally infected with *L. chagasi*

For all infected animals (66), the number and size (diameter) of hepatic granulomas was determined by quantification of 20 microscope optic fields using the 40 \times objective of an Axiolab light microscope (Zeiss). The images, viewed on a computer video screen, were obtained by means of the software and relayed to a computer-assisted image analysis system (Kontron Electronic/Carl Zeiss, Germany). Using a digital pad, the total diameter of granulomas was measured and the results were expressed in square micrometers (μm^2) (Caliari, 1997; Goncalves et al., 2003).

2.7. Immunocytochemical and morphometrical methods for studying *Leishmania* parasite load of hepatic granulomas

For all infected animals (66), the parasite load of intralobular hepatic granulomas was determined by quantification of 20 microscope optic fields using the 40 \times objective of an Axiolab light microscope (Zeiss). The images, viewed on a computer video screen, were obtained as previously described in Section 2.6. Thus, the granulomas were first isolated using a mouse pad where only the area of the granuloma was analyzed. Immunolabeled amastigotes were quantified in the granuloma by the software KS300 (Caliari, 1997). Analysis methods for isolating granulomas areas or labeled amastigotes determination through KS300 semi-automatic macro assembler was standardized in according to Caliari (1997) and Caliari et al. (2006).

2.8. Statistical analysis

The Graph pad Instat for Windows software 3.0 was used for descriptive and inferential analysis. For immunolabeled amastigotes we used the Mann Whitney test. For CR3 receptor expression statistical analysis the non-parametric Kruskal–Wallis test was used. For liver histological studies (granulomas) the *T*-test was performed. For correlations analysis (CR3 versus parasitism load) the *Pearson* parametric analysis was used.

3. Results and discussion

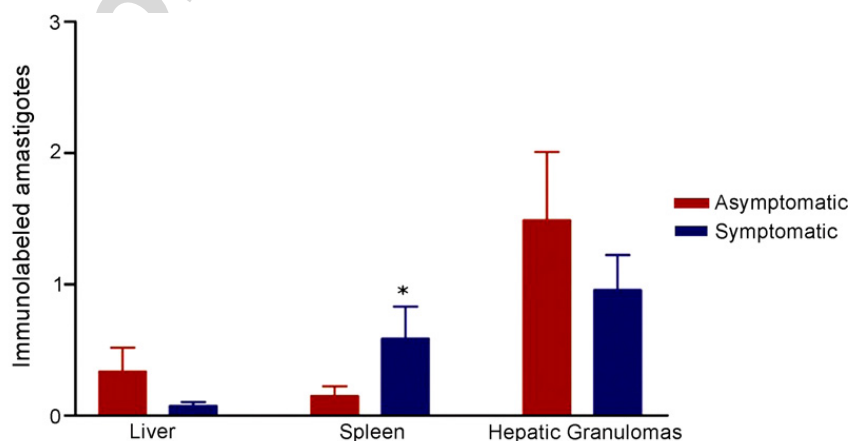
The immunohistochemical data showed statistical differences in the parasite load in spleens. In fact, symptomatic dogs showed a higher parasite load than asymptomatic ones ($p = 0.0221$). On the other hand, the liver parasite load was higher than symptomatic dogs, but it was not confirmed by statistical analysis (Graph 1). Sanchez et al. (2004) demonstrated higher liver and spleen parasite loads in symptomatic naturally-infected dogs from an endemic area of Venezuela. However, in this study, we found only a statistical positive correlation with spleen tissue parasite load and the animals with a definite clinical status.

In all forty liver samples (30 infected animals and 10 controls) we found CR3 positive cells mainly in the sinusoid vessels (Fig. 1A). Moreover, in infected animals CR3 positive cells were also observed in the hepatic granulomas (Fig. 1B). In spleens of infected animals, we found CR3 positive cells mainly around the white pulp (marginal zone) and red pulp (Fig. 1C and D). The CD18 positive cells mainly occurred in sinusoid vessels and granuloma cells in livers. In spleens, this

positive staining occurred in the marginal zones and in the red pulp. In addition, the CD11b positive staining showed the same distribution as the CD18, but the number of CD18 positive cells in both organs was higher than CD11b. This was expected because CD18 is a common subunit ($\beta 2$ subunit denominated CD18) of the molecule CR3 which is found on all inflammatory cells (DeSimone et al., 1987; Hynes, 1992). These results and the immunohistochemical antigen tissue distribution pattern was the same as that observed by Tafuri et al. (1996) for both organs in dogs naturally and experimentally infected with *L. chagasi*.

The quantitative study carried out by morphometrical analysis revealed a higher CD11b/CD18 integrin expression in infected animals than in controls, as described by Tafuri et al. (1996) in a qualitative study. However, in this study the liver samples showed that asymptomatic animals had higher CD11b/CD18 expression than symptomatic ones which was confirmed by statistical analysis ($p = 0.0016$ and 0.013 , respectively) (Graphs 2 and 3). In contrast to the liver CR3 data, spleen samples from symptomatic animals showed higher CD11b/CD18 expression than asymptomatic ones. This was confirmed by statistical analysis ($p = 0.0418$ and 0.0325 , respectively) (Graphs 2 and 3).

Concerning the parasite load versus CR3 expression in both organs of all infected animals, we found a positive correlation between CD11b/CD18 integrin expression and spleen parasite load ($r^2 = 0.0476$ and 0.1936 , respectively). Thus, CD11b/CD18 expression follows higher parasite loads, at least in spleens. In contrast, in livers a negative correlation exists between CD11b/CD18 integrin expression and parasite load ($r^2 = 0.0254$ and 0.0156 , respectively). Thus, we have found a distinct CR3 (CD11b/CD18) expression response in livers and spleens. Moreover, asymptomatic



* Significant difference asymptomatic and symptomatic spleen parasite load ($p=0,0221$)

Graph 1. Parasitism tissue load in liver, spleen and hepatic granulomas of naturally infected dogs with *L. chagasi*.

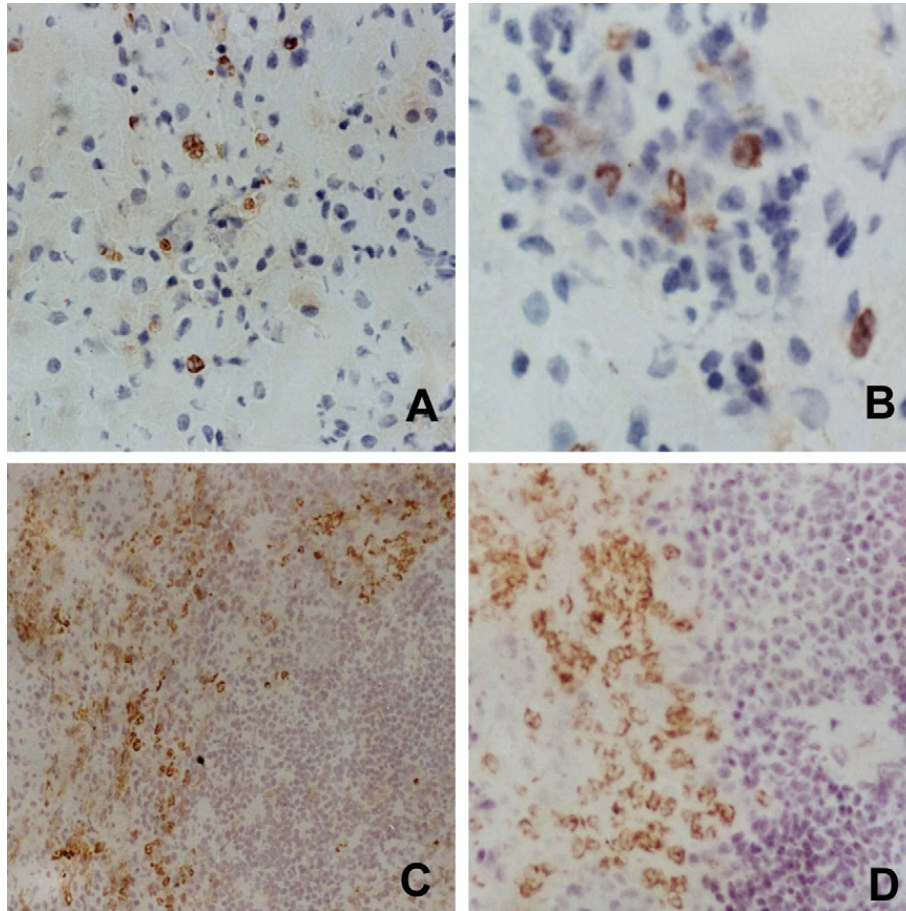
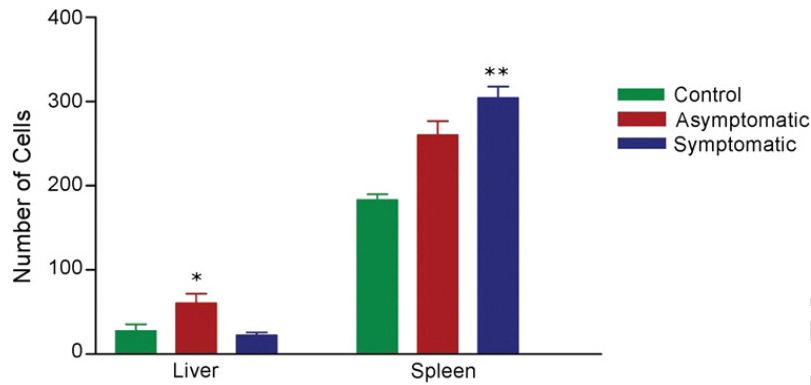


Fig. 1. Frozen liver (A, B) and spleen (C, D) sections of naturally infected dogs with *L. chagasi*. Streptoavidin-peroxidase with Hematoxylin counter staining. (A) Note CR3 positive cells mainly in the sinusoid vessels 220 \times ; (B) CR3 positive cells were also observed in the hepatic granulomas 440 \times ; (C) CR3 positive cells mainly around the white pulp (marginal zone) and red pulp 110 \times ; and (D) higher magnification showing positive cells of the marginal zone 220 \times . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

dogs showed a higher number of CD11b/CD18 positive cells than symptomatic ones associated with a tendency to have a lower parasitism hepatic burden. There is an inverse correlation between CR3 expressing cells and the parasitism burden in livers. On the other hand, we found a positive correlation between the parasite load and CR3 positive cells in spleens. Our results have shown that CR3 positive expression is increased with the parasitism load. Therefore, spleens could act as an organ to perpetuate the infection. Hence, we could consider that there is an organ specific immunity response as discussed by Engwerda et al. (2004) and Teixeira et al. (2006) in visceral leishmaniasis. In fact, Engwerda et al. (2004) discussed experimental models of VL as a clear representation of contrasting outcomes of infection in liver and spleen. Mice infected with amastigotes forms of *L. donovani* show evident amastigote growth from the earliest times post-infection, but are brought under control around 28 days post-infection. In contrast, after an early acute

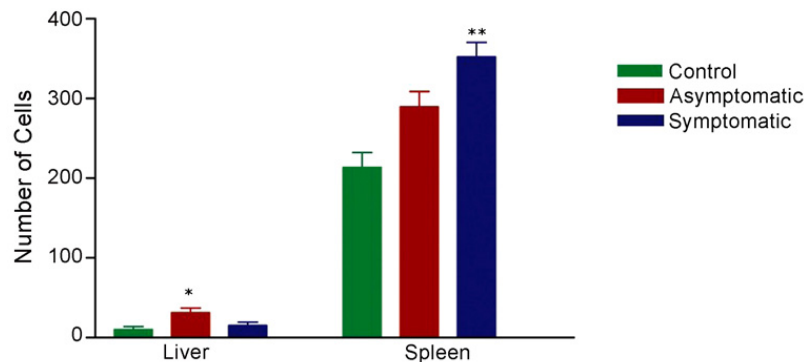
phase where amastigote replication is not evident, the spleen shows exaggerated splenomegaly with a persistent presence of amastigotes. Teixeira et al. (2006) have discussed the role of chemokines and chemokine receptors in the development of the Th1 response where it has been implicated in T cell amplification during the inflammatory response, an important step for protective host defense in visceral leishmaniasis. However, only CXCL10 expression, amplified by T cells, remains high during the late phase, and this is essential to enable liver granuloma formation and the inflammatory response. Monocytic cells attracted by MIP-1a and CCL2, following IFN- γ stimulation, could be the source of Th1-mobilizing chemokines, such as CXCL10 (IFN-inducible protein 10 or IP-10). Unlike liver cells, spleen cells from *Leishmania infantum*-infected mice produce both Th1- and Th2-type cytokines, with the Th2-type response being dominant. This is compatible with the sustained expression of CCL2 rather than CXCL10, thereby



* Significant difference of asymptomatic and symptomatic CD11b liver cell expression ($p=0.0016$)

**Significant difference of asymptomatic and symptomatic CD11b spleen cell expression ($p=0.0418$)

Graph 2. Cell expression of CD11b in liver and spleen of naturally infected dogs with *L. chagasi*.



* Significant difference of asymptomatic and symptomatic CD18 liver cell expression ($p=0.0130$)

**Significant difference of asymptomatic and symptomatic CD18 spleen cell expression ($p=0.0325$)

Graph 3. Cell expression of CD18b in liver and spleen of naturally infected dogs with *L. chagasi*.

showing that there is an influx of macrophages rather than T cells into the spleen.

In experimental visceral leishmaniasis, caused by *L. donovani* (Cervia et al., 1993; McElrath et al., 1988; Murray, 2001) or *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) (Leclercq et al., 1996; Wilson et al., 1996; Rousseau et al., 2001), hepatic infection is usually self-limiting, and the hepatic immune response is a good example of a mononuclear cell-dominated granulomatous inflammatory response, where it is necessary to kill *Leishmania* (Sheffield, 1990; Murray and Nathan, 1999; Hernandez-Pando et al., 2000; Murray, 2001; Kaye et al., 2004). In this work, all the livers sampled from all infected dogs showed a chronic inflammatory reaction characterized by intralobular granuloma formations, as previously discussed in the literature in experimentally infected dogs (Gonzalez et al., 1988; Oliveira et al., 1993) and naturally infected dogs with *L. chagasi* (Tafari et al., 1996). This lesion was also noted in human visceral leishmaniasis (el Hag et al., 1994). Our histomorpho-

metrical analysis showed asymptomatic animals with higher numbers of granulomas than symptomatic animals ($p = 0.0018$) (Table 1), but the granuloma parasite load was not different significant (Graph 1). On the other hand, there was no statistical difference in the diameter of the granulomas between both groups. Moreover, there was a negative correlation with the hepatic parasite load. This means that the parasitism decreases while granuloma diameter increases (Table 1).

In the literature, there are studies showing the importance of CD18 positive cells of the hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis. Sanchez et al. (2004) described a distinct canine immune response against *L. chagasi* in target organs. The livers of asymptomatic animals showed effective immunity with well-organized granulomas walling off the parasites in an environment of effector T cells expressing CD44^{low}, CD45RO^{hi}, CD44^{hi}, CD45RO^{low}, MHC class II, CD11c and CD18 integrins. In

Table 1
Hepatic granulomas of naturally infected dogs with *L. chagasi* analysis

Parameter	Clinical groups analysis		Statistical analysis
	Asymptomatic dogs (media ± S.D.)	Symptomatic dogs (media ± S.D.)	
Hepatic granulomas number	16.55 ± 2.24	10.40 ± 3.21	$p = 0.0018$ (<i>T</i> -test)
Hepatic granulomas area	3939.0 μ^2 ± 631.1	3733.9 μ^2 ± 842.2	$p = 0.6618$ (<i>T</i> -test)
Hepatic granulomas parasite load	1.4989 ± 0.52	0.9573 ± 0.27	$p = 0.3270$ (<i>T</i> -test)
Correlation analysis			
Parameter of correlations	Statistical analysis		
Hepatic granulomas area and parasite tissue load	$r^2 = -0.2254$; $p = 0.0459$ (Pearson correlation)		
Hepatic granulomas area and granulomas parasite load	$r^2 = -0.1175$; $p = 0.1815$ (Pearson correlation)		
Hepatic granulomas area and hepatic granulomas number	$r^2 = 0.2881$; $p = 0.0329$ (Pearson correlation)		

contrast, symptomatic livers showed a non-organized and non-effective infiltrate composed of T cells and heavily parasitized Kupffer cells and a diminished expression of activation molecules including CD18. On the other hand, asymptomatic dogs and symptomatic animals showed similar immune responses in the spleens. All infected animals had the same proportions of cells expressing CD18 molecules.

The importance of CD11b/CD18 (CR3) revealed in this organ-specific study of canine visceral leishmaniasis reflects the findings of the experimental visceral leishmaniasis caused by *L. donovani* (McElrath et al., 1988; Murray, 2001) or *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) (Leclercq et al., 1996; Wilson et al., 1996; Rousseau et al., 2001). In addition, basic *in vitro* experimental studies involving *L. major* and murine macrophages developed by Mosser and Edelson (1987) and Rosenthal et al. (1996) have demonstrated two basic things: (1) CR3 is the predominant complement receptor responsible for the phagocytosis of complement opsonized metacyclic promastigotes; (2) after phagocytosis (monocytes/macrophages internalization) the survival of the intracellular amastigotes forms of *Leishmania* was potentially increased. These authors found that CR3 is not only crucial for interaction with serum opsonized promastigotes, but these receptors also enhance their intracellular survival.

Bringing these ideas to bear on canine visceral leishmaniasis, our group has recently demonstrated the importance of CR3 molecules in the uptake of *L. chagasi* promastigotes by canine macrophages (Goncalves et al., 2005). Here, considering that the symptomatic animals showed higher parasite loads and CD11b/CD18 expression in their spleens, we can conclude that these splenic cells (monocyte-macrophages) might serve to perpetuate intracellular infection.

Acknowledgements

We thank the Zoonosis Control Center of the municipality of Belo Horizonte and Sabará, Minas Gerais, for the kind donation of the study animals. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG Grant CDS2263/97; EDT-2124/03) and Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa Tecnológica e Científica (grant CNPq 472287/01-0 – NV).

References

- Andrade, H.M., de Toledo Vde, P., Marques, M.J., Franca Silva, J.C., Tafuri, W.L., Mayrink, W., Genaro, O., 2002. Leishmania (*Leishmania*) *chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet. Parasitol.* 103, 71–81.
- Basu, M.K., Ray, M., 2005. Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 145–154.
- Burns Jr., J.M., Shreffler, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaro, R., Reed, S.G., 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 775–779.
- Caliari, M.V., 1997. *Princípios de Morfometria Digital*, vol. 01. Editora da UFMG, Belo Horizonte, p. 150.
- Caliari, M.V., de Lana, M., Caja, R.A., Carneiro, C.M., Bahia, M.T., Santos, C.A., Magalhaes, G.A., Sampaio, I.B., Tafuri, W.L., 2002. Immunohistochemical studies in acute and chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Virchows Arch.* 441, 69–76.
- Caliari, M.V., de La Lana, M., Caja, R.A., Carneiro, C.M., Bahia, M.T., Santos, C.A., Magalhaes, G.A., Cassali, G.D., Sampaio, I.B.M., Tafuri, W.L., 2006. Expression of caCD44, caCD45 and caMHCII in acute and chronic chagasi cardiomyopathy: standardization through KS300 macro assembler. *Braz. J. Invest. Pathol. Morphol. Morphom.* 1, 15–23.
- Cervia, J.S., Rosen, H., Murray, H.W., 1993. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 61, 1330–1333.

- DeSimone, D.W., Stepp, M.A., Patel, R.S., Hynes, R.O., 1987. The integrin family of cell surface receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 15, 789–791.
- el Hag, I.A., Hashim, F.A., el Toum, I.A., Homeida, M., el Kalifa, M., el Hassan, A.M., 1994. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *J. Clin. Pathol.* 47, 547–551.
- Engwerda, C.R., Ato, M., Kaye, P.M., 2004. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 20, 524–530.
- Goncalves, R., Tafuri, W.L., Melo, M.N., Raso, P., 2003. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a histopathological and morphometric study. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 45, 153–158.
- Goncalves, R., Vieira, E.R., Melo, M.N., Gollob, K.J., Mosser, D.M., Tafuri, W.L., 2005. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infect. Dis.* 5, 39.
- Gonzalez, J.L., Rollan, E., Novoa, C., Castano, M., 1988. Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. *Histol. Histopathol.* 3, 323–329.
- Handman, E., Bullen, D.V., 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18, 332–334.
- Hernandez-Pando, R., Bornstein, Q.L., Aguilar Leon, D., Orozco, E.H., Madrigal, V.K., Martinez Cordero, E., 2000. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology* 100, 352–358.
- Houghton, R.L., Petrescu, M., Benson, D.R., 1988. A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J. Infect. Dis.* 177, 1339–1344.
- Hynes, R.O., 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11–25.
- Kane, M.M., Mosser, D.M., 2000. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 26–31.
- Kaye, P.M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S., Engwerda, C.R., 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol. Rev.* 201, 239–253.
- Leclercq, V., Lebastard, M., Belkaid, Y., Louis, J., Milon, G., 1996. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J. Immunol.* 157, 4537–4545.
- Lima, W.G., Michalick, M.S., de Melo, M.N., Luiz Tafuri, W., 2004. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.* 92, 43–53.
- Madeira, M., Barbosa-Santos, E., Marzochi, M., 1999. Experimental infection of canine peritoneal macrophages with visceral and dermatropic *Leishmania* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 645–648.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 566–567.
- Mauricio, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today* 16, 188–189.
- McElrath, M.J., Murray, H.W., Cohn, Z.A., 1988. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 167, 1927–1937.
- Mosser, D.M., Edelson, P.J., 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania promastigotes*. *J. Immunol.* 135, 2785–2789.
- Mosser, D.M., Edelson, P.J., 1987. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* 327, 329–331.
- Mosser, D.M., Springer, T.A., Diamond, M.S., 1992. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell. Biol.* 116, 511–520.
- Mosser, D.M., Rosenthal, L.A., 1993. *Leishmania*–macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin. Cell Biol.* 4, 315–322.
- Murray, H.W., Nathan, C.F., 1999. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.* 189, 741–746.
- Murray, H.W., 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 249–267.
- Oliveira, G.G., Santoro, F., Sadigursky, M., 1993. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88, 243–248.
- Rosenthal, L.A., Sutterwala, F.S., Kehrl, M.E., Mosser, D.M., 1996. *Leishmania major*–human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect. Immun.* 64, 2206–2215.
- Rousseau, D., Demartino, S., Anjuere, F., Ferrua, B., Fragaki, K., Le Fichoux, Y., Kubar, J., 2001. Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. *Eur. Cytokine Netw.* 12, 340–347.
- Sanchez, M.A., Diaz, N.L., Zepa, O., Negron, E., Convit, J., Tapia, F.J., 2004. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 618–624.
- Sheffield, E.A., 1990. The granulomatous inflammatory response. *J. Pathol.* 160, 1–2.
- Sundar, S., Rai, M., 2002. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15, 593–598.
- Tafuri, W.L., Barbosa, A.J., Michalick, M.S., Genaro, O., Franca-Silva, J.C., Mayrink, W., Nascimento, E., 1996. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38, 81–89.
- Tafuri, W.L., Santos Rde, L., Arantes, R.M., Goncalves, R., de Melo, M.N., Michalick, M.S., 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods* 292, 17–23.
- Teixeira, M.J., Teixeira, C.R., Andrade, B.B., Barral-Netto, M., Barral, A., 2006. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 22, 32–40.
- Wilson, M.E., Sandor, M., Blum, A.M., Young, B.M., Metwali, A., Elliott, D., Lynch, R.G., Weinstock, J.V., 1996. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.* 156, 2231–2239.

Methodology article

Open Access

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

Sílvio Coura Xavier¹, Héliida Monteiro de Andrade², Semíramis Jamil Hadad Monte², Ingrid Maria Chiarelli³, Wanderson Geraldo Lima⁴, Marilene Suzan Marques Michalick⁵, Washington Luiz Tafuri⁴ and Wagner Luiz Tafuri*³

Address: ¹Departamento de Clínica e Cirurgia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, ²Departamento de Parasitologia, Laboratório de Biologia Molecular e Imunogenética, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil, ³Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, ⁴Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil and ⁵Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brasil

Email: Sílvio Coura Xavier - silvioxavier@hotmail.com; Héliida Monteiro de Andrade - handrade@cpqrc.fiocruz.com.br; Semíramis Jamil Hadad Monte - libpi@ufpi.br; Ingrid Maria Chiarelli - ingridmedvet@hotmail.com; Wanderson Geraldo Lima - limaw_g@yahoo.com.br; Marilene Suzan Marques Michalick - michalick@icb.ufmg.br; Washington Luiz Tafuri - wltafuri@yahoo.com.br; Wagner Luiz Tafuri* - wagner@icb.ufmg.br

* Corresponding author

Published: 08 June 2006

Received: 17 January 2006

BMC Veterinary Research 2006, 2:17 doi:10.1186/1746-6148-2-17

Accepted: 08 June 2006

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/17>

© 2006 Xavier et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: We compared skin biopsy samples from different anatomical regions for detecting *Leishmania* in dogs, using histological (HE), immunohistochemical (IHC) and polymerase chain reaction (PCR) techniques.

Results: The sensitivity was 82.8 percent for PCR, 62.1 percent for IHC and 44.8 percent for HE. These methods do not appear to depend on the clinical status of the animal or the anatomical source of the skin sample; there is no "best region" for any method. However, PCR was more effective than IHC and HE for ear and nose skin samples whereas IHC was better than HE for nose samples. There was weak agreement between PCR and HE for all tissue samples; good agreement between PCR and IHC for ear and abdomen samples, and weak agreement for nose; and optimal agreement between IHC and HE for ear and abdomen and good agreement for nose samples.

Conclusion: The PCR on ear skin could be the best procedure for diagnosing canine visceral leishmaniasis. The good agreement between PCR and IHC indicates that IHC can be used as an alternative method. Finally, tissue samples from ears, nose and abdomen, particularly ears and nose, are potentially useful for diagnosing canine visceral leishmaniasis independently of the animal's clinical status.

Background

Leishmaniasis is endemic in many areas of tropical and subtropical America [at least 24 countries], where it constitutes a significant public health problem. The disease in this region is basically a zoonosis; humans are only incidental hosts in the life cycles of the various pathogenic parasite species [11]. In America, Zoonotic Visceral Leishmaniasis [ZVL] is caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) [20], and domestic dogs (*Canis familiaris*) are established as reservoir hosts. Visceral Leishmaniasis is endemic in European, Asiatic and Africa countries, and new areas in which the infection is being disseminated are being identified [9,12,21]. Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) exists in about 50 of the 88 countries in which human leishmaniasis is present, and there are three major foci: China, the Mediterranean Basin and Brazil [3].

Control of leishmaniasis in the New World is complicated by the variety of different *Leishmania* species and their diverse clinical manifestations, and by the fact that each parasite species has a unique epidemiological pattern. Since a combined risk exists for both canine and human infections in areas where ZVL is endemic, there is a need for sensitive and specific diagnostic techniques [11]. Serological testing can identify exposure to the parasite but cannot indicate an active infection. Some years ago, the reference standard for diagnosis was the demonstration of parasite by either microscopy or culture of aspirates from spleen, lymph nodes or bone marrow. However, the overall sensitivity of these methods in humans and dogs is variable and relatively poor [24]. Direct parasite detection on histological skin biopsies, which can be obtained by an extremely simple surgical procedure, is a good tool for a definitive diagnosis and for clinical follow-up of dogs undergoing treatment. However, examination of routinely prepared histological sections stained with Hematoxylin and Eosin [HE] is frequently inconclusive, particularly in the skin [6,10,29]. Immunohistochemical detection of *Leishmania* amastigotes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine [6,10] and human [15] tissues has previously been described and is routinely used in many laboratories. Recently, an alternative immunohistochemical method was described that could be a useful tool for epidemiological, clinical and histopathological studies [30]. In the last decade, the polymerase chain reaction (PCR) was shown to be sensitive and specific for demonstrating *Leishmania* DNA. In recent years, PCR has considerably improved the diagnosis of canine leishmaniasis, showing 89 to 100% sensitivity in symptomatically or parasitologically confirmed cases [3]. A variety of canine tissues including bone marrow, spleen, lymph nodes, skin and conjunctival biopsy specimens have been used for diagnosis. Blood and bone marrow are the most frequently used tissues for PCR diagnosis in dogs; however, the skin is considered an important tissue

reservoir of parasites in both healthy and sick *Leishmania*-infected dogs [1,25,26]. Moreover, positive PCR has been shown to be a better indicator in skin (51%) than in bone marrow (17.8%) or conjunctiva (32%) [25]. PCR using noninvasively obtained samples will be useful for epidemiological studies and for direct diagnosis of canine visceral leishmaniasis [8,27].

The aim of this study was to compare three indirect methods for detecting *Leishmania* in canine skin biopsies obtained from different anatomical regions. Histopathological (HE), immunohistochemical (IHC) and polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of *Leishmania* were analyzed and their relative efficacies were considered.

Results

Histologically, skin samples showed a chronic inflammatory reaction irrespective of anatomical region, but this reaction varied with the animal's clinical status. In general, the reaction ranged in intensity from discrete to moderate. However, an intense inflammatory process was more frequent in some cases. It was detected only in ear skin biopsies from oligosymptomatic and symptomatic animals. In general, the chronic inflammatory reaction was characterized by a mononuclear infiltrate and was diffuse in the upper dermis and focal around vessels, pyli and glands of the deep dermis [fig. 1(a), 1(b)]. Parasites were more readily identified in ear biopsies than in biopsies from nose and abdominal samples, but the parasite load determined by optical microscopy (HE) showed no statistical differences. However, there was a tendency towards a higher parasite load in ear skin tissue specimens than in the others (data not shown). Numerous immunolabeled amastigote forms of *Leishmania* were readily observed in skin tissues. Moreover, the IHC method improved the HE parasite load data [figs 1(c), 1(d) and figure 2]. In addition, when we compared the parasite load with the definite clinical status of the animal (without parasite load classification), the numbers of positive symptomatic dogs were higher than asymptomatic and oligosymptomatic ones.

Like the HE results, the IHC parasite tissue load data showed no clear relationship to the inflammatory infiltrate. Moreover, we found symptomatic animals with an intense inflammatory infiltrate but without amastigotes, and asymptomatic animals with a discrete inflammatory reaction but many macrophages loaded with amastigotes [Figs 1(e), 1(f)].

The sensitivities of the tests used were calculated using optical microscopy (OM) as gold standard. All 29 animals were OM positive. PCR was positive in 24 dogs, IHC in 18

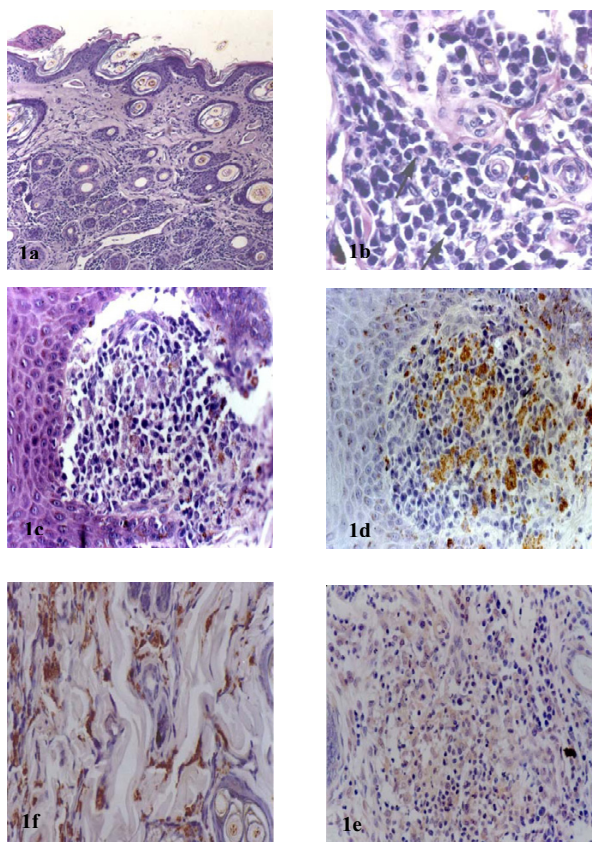


Figure 1(a)
Ear skin section of naturally infected animal. Observe a diffuse inflammatory cellular exudate in up dermis and focal around vessels, pylous and glands of deep dermis. HE 40×. **B Ear skin section of naturally infected animal.** Observe a diffuse inflammatory mononuclear exudate (arrows showing plasmocytes) in a dermis. HE 440×. **C Nose skin section of naturally infected animal.** Observe an intense inflammatory exudate of mononuclear cells in a dermis. HE 110×. **D Nose skin section of naturally infected animal.** Observe innumerous imunolabelled amastigotes forms of *Leishmania*. Streptavidin-peroxidase method. 110×. **E Ear skin section of symptomatic naturally infected animal.** Intense inflammatory exudate can be observed. Note the absence of amastigotes forms of *Leishmania* HE 440×. **F Ear skin section of asymptomatic naturally infected animal.** Innumerous amastigotes of *Leishmania* can be observed. Note the absence of inflammatory exudate. HE 440×.

and HE in 13. The sensitivities were therefore 82.76% for PCR, 62.07% for IHC and 44.83% for HE.

When we compared the PCR, IHC and HE methods according clinical status using ear, nose and abdomen skin samples, there was higher positivity for PCR than IHC and HE, respectively, for all clinical groups. The

asymptomatic positivity was higher for PCR method. However, the sample size was not large enough to qualify for statistical significance (Table 1).

In according to Table 2, considering the three methods together for *Leishmania* detection with skin biopsies from different anatomical regions (each line) we found the following results: (1) PCR is better than IHC and HE for ear skin biopsies ($p < 0.05$); (2) nose skin biopsies give statistically different results for all diagnostic methods, PCR detecting more positive cases followed by IHC and HE; (3) abdominal biopsies show no statistically significant results for any of the three methods.

In addition, the comparison of the skin biopsies from different anatomical regions for each diagnosis method (each column on Table 2) did not show any statistical differences. This means that one anatomical skin region is no more useful than any other for a given test method. Index κ was used to calculate the agreement among the three tests. IHC and PCR agreement well for ear ($\kappa = 0.5$) and abdomen ($\kappa = 0.4$) skin tissues, but weakly for nose ($\kappa = 0.2$). PCR and HE agreement weakly for ear ($\kappa = 0.3$), abdomen ($\kappa = 0.2$) and nose ($\kappa = 0.05$). IHC and HE agreement optimally for ear ($\kappa = 0.8$) and abdomen ($\kappa = 0.8$) and showed good agreement for nose ($\kappa = 0.5$).

Discussion

Serological techniques for diagnosing *Leishmania* such as the immunofluorescence antibody test (IFAT), direct agglutination test (DAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot-ELISA and Western blot are widely used. Although they are clinically very useful, these methods underestimate the infection rate of *Leishmania* in dog populations in endemic areas [3,22]. For canine visceral

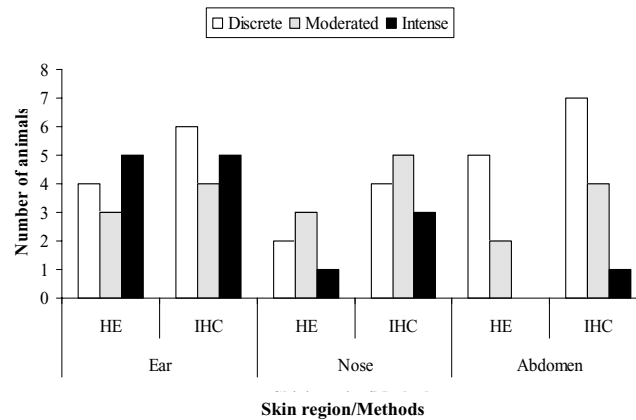


Figure 2
Leishmania amastigotes visualized by histopathological (HE) and immunohistochemical (ICH) methods in skin biopsies. Parasitism load classified as discrete, moderated and intense.

Table 1: Comparison of *Leishmania* detection by polymerase chain reaction (PCR), immunohistochemical (IHC) and histopathological (HE) methods in biopsies from distinct skin anatomical locations according to clinical status: asymptomatic (n = 10), oligosymptomatic (n = 10) and symptomatic (n = 9)

Method	Clinical Group	SKIN LOCATION			% POS (positive at last one location)
		Ear	Nose	Abdomen	
PCR	Asymptomatic	7	6	2	90%
	Oligosymptomatic	7	8	5	80%
	Symptomatic	7	5	7	78%
IHC	Asymptomatic	3	4	4	70%
	Oligosymptomatic	4	2	2	40%
	Symptomatic	7	5	5	78%
HE	Asymptomatic	3	2	2	30%
	Oligosymptomatic	4	1	2	40%
	Symptomatic	5	7	1	67%

leishmaniasis, no technique is 100% sensitive and specific and can serve as "gold standard" for diagnosis [3], but direct observation of the parasite in stained smears or tissue sections must be regarded as conclusive. In the last decade, PCR has had the greatest success because of its high sensitivity and specificity [5,19]. PCR can be carried out using genomic or kinetoplast parasite DNA on blood, skin, lymph node, conjunctiva or bone marrow samples from infected animals. However, although blood and bone-marrow are mostly used, skin merits special consideration. Dogs naturally infected with *L. infantum* harbor high numbers of parasites in skin irrespective of the presence of lesions [1,25]. Moreover, skin tissue is a good substrate for PCR diagnosis [18].

Few publications have considered application of PCR to different canine tissues for detecting *Leishmania* infection. Solano-Gallego et al. (2001) [25] showed that 51% of positive animals were identified from skin analysis versus 32% from conjunctiva and 17.8% from bone marrow. Moreover, PCR results from specimens of skin have demonstrated higher sensitivity (87.2%) than spleen (84.6%), liver (80%), lymph nodes (76.9%) or bone marrow (66.7%) [4]. In this work we considered HE, IHC and PCR methods for detecting *Leishmania* in three different skin biopsies (ears, nose and abdomen). All samples utilized were embedded in paraffin and maintained at room temperature. This is important, especially for PCR, because it works even after a long storage time. Based on the MO method as "gold standard" for diagnosis, the sensitivities of the three methods were: PCR 82.8%, IHC 62.1% and HE 44.8%. The PCR sensitivity value accords with previous work: 60% [19], 71.4% [4], 87% [16] and up to 100% [5]. We have not found IHC or HE sensitivity values in the literature. The use of IHC to detect amastigotes in canine tissues has been reported previously and has undoubtedly

proved efficient for diagnosis. In this paper we employed a straightforward and inexpensive immunohistochemical approach for detecting *Leishmania* in formalin-fixed, paraffin-embedded canine tissues [30]. We still do not have conclusive results for absolute sensitivity values, but our data show an increase in the number of positive animals [parasite detected] when IHC is compared to HE. Indeed, Bourdoiseau et al. (1997) [6] reported that HE is a good tool for describing lesions, but has low sensitivity for detecting *Leishmania*.

In according to Table 1 PCR was higher positive absolute numbers in asymptomatic and oligosymptomatic dogs and PCR, HE or IHC was independent of the clinical status and tissue origin. However, our sample size was not large enough to qualify for statistical significance. Thus, we did not find statistical difference among the three methods in respect of the clinical status of the animals or the anatomical region from which the skin biopsy was taken. This could indicate that asymptomatic dogs have parasites in the skin just as symptomatic dogs do, underlining the importance of asymptomatic dogs in the epidemiology of visceral leishmaniasis, as discussed by Abranches et al. (1998) [2] in Portugal, Solano-Gallego et al. (2001) [25] in Spain and Lima et al. (2004) [14] in Brazil. Solano-Gallego et al. (2001) [25], for example, showed that PCR was able to detect subclinical canine *Leishmania* infection.

PCR, IHC and HE were simultaneously studied in the three different canine skin samples. PCR was better than IHC and HE for ear and nose skin samples. As PCR method is able to demonstrate *Leishmania* DNA in the investigate samples, it could explained these data.

Table 2: Comparison among polymerase chain reaction (PCR), immunohistochemical (IHC) and histopathological (HE) methods for *Leishmania* detection versus canine skin biopsies from different anatomical locations in 29 naturally infected dogs

Skin region	PCR +	(%)	IHC +	(%)	HE +	(%)
Ear	21 ^a	(72.4%)	14 ^b	(48.3%)	12 ^b	(41.4%)
Nose	19 ^a	(65.5%)	11 ^b	(37.9%)	5 ^c	(17.2%)
Abdomen	14 ^a	(48.3%)	11 ^a	(37.9%)	5 ^a	(17.2%)

Each data point is associated a one letter (a, b or c). Data with the same letters means no statistical difference. Otherwise, different letters means statistical difference. Each line: Letters a, b, c, represent statistical analysis considering the three methods together. Different letter were used to significant differences, chi-square test ($p < 0.05$).

Optical microscopy revealed parasites (IHC and HE) easier in ear skin specimens than in nose or abdomen samples. In addition, the chronic inflammatory reaction in ear samples was more intense in oligosymptomatic and symptomatic dogs. On the other hand, PCR detected higher numbers of positive animals, followed by IHC and HE; in this case, IHC was better than HE. It is important to say that IHC improved the detection of positive infection by almost fifty percent over HE, as depicted in fig. 1(c), 1(d). PCR, IHC and HE data on the abdomen skin samples showed no statistical differences. These results corroborated the HE and IHC results, because abdomen skin specimens showed lower inflammation and parasite load in all cases.

Conclusion

Taking these results together, we can suggest that PCR was the best method for diagnosing canine infection by *Leishmania*. However, we can not infer what skin anatomical regions is the best for diagnosing the infection. On the other side, ear skin biopsies is a non-invasive procedure and easier to perform than skin biopsies of other anatomical regions. Moreover, it is less blood-irrigated and the anatomical location is more comfortable for both the animal and the veterinary practitioner. Thus, we think that PCR skin ear biopsy could be used as the best method for diagnosing canine infection by *Leishmania*. However, precautions have to be taken in order to interpret PCR results as a signal of animal infectivity, because PCR positive detection does not necessarily indicate alive parasites in tissues. Until now it has not be demonstrated that all PCR positive dogs are infective.

The good agreement between PCR and IHC indicates that IHC can be used as an alternative method. Finally, skin samples from ears, nose and abdomen, mainly ears and nose, are a potentially useful tissue source for diagnosing canine visceral leishmaniasis independently of the animal's clinical status.

Methods

Animals

Twenty-nine mongrel dogs of unknown age naturally infected with *Leishmania* were identified during an epi-

miological survey of canine visceral leishmaniasis carried out by the municipality (Zoonosis Department) of Belo Horizonte, MG, (Brazil Southeastern). The tests used were indirect immunofluorescence antibody titres (IFAT), complement fixation reaction (CFR), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunofluorescent titres ($> 1:40$ dilutions), CFR ($> 1:40$ dilutions) and ELISA (Optical Density > 100 ; $> 1:400$ dilutions) were positive (IgG) for all animals. In addition, we tested with a commercial kit containing an immunochromatographic strip that uses recombinant leishmanial antigen k39. This is a dominant amastigote antigen of *Leishmania chagasi* (rK39) and is highly sensitive and specific for *Leishmania donovani* complex infection, as previously described [7,13,28]. Sera from all infected dogs were also positive for this test. All infected dogs were clinically classified according to a previously reported study [14,17], as follows: asymptomatic apparently healthy animals ($n = 10$), oligosymptomatic animals exhibiting some clinical signs of the disease and/or lesions such as lymphoid adenopathy, moderate weight loss and/or dull brittle hair accompanied by cutaneous lesions ($n = 10$) and symptomatic animals that exhibited the classical signs of the disease such as cutaneous alterations (alopecia, dry exfoliative dermatitis or ulcers), onychogryphosis, keratoconjunctivitis, cachexia and anemia ($n = 9$).

Necropsy, parasitological diagnosis and histopathology

Dogs were sacrificed with a lethal dose of 2,5% (1,0 ml/Kg) Thiopental (intravenous) and and T61™ (0,3 ml/Kg). During necropsy, tissue touch preparations (smears) of liver, spleen and lymph node samples were obtained to confirm *Leishmania* infection. The smears were air-dried and Giemsa stained. The presence of *Leishmania* amastigotes was detected in all animals by light microscopy using oil immersion (1000 × magnification). In addition, livers and spleens specimens were collected from all the dogs for histopathology. Amastigote forms of *Leishmania* could be observed inside macrophages in all the livers and spleens. Samples skin tissue from ear, nose and abdomen were collected and fixed in 10% neutral buffered formalin. All tissue samples were dehydrated, cleared, embedded in paraffin, cut into 4–5 μm thick sections and stained with Hematoxylin and Eosin (HE). We classified all skin sam-

ples in terms of chronic dermal inflammation, grading this reaction as discrete (a diffuse inflammatory mononuclear cell infiltrate in the upper dermis), moderate (a diffuse and localized cellular infiltrate around glands and vessels in the deep dermis) or intense (a diffuse cellular infiltrate in all dermis layers).

Immunohistochemical (IHC) method for labeling amastigotes of *Leishmania*

Deparaffined slides were hydrated and incubated in 4% hydrogen peroxide (30 v/v) in 0.01 M PBS, pH 7.2, followed by incubation with normal goat serum (diluted 1:100). A heterologous immune serum from dogs naturally infected with *L. chagasi* (diluted 1:100 in 0.01 M PBS) was used as primary antibody. Slides were incubated for 18–22 h at 4°C in a humid chamber. After washing in PBS, the slides were incubated with biotinylated goat anti-mouse and anti-rabbit (Link-DAKO, LSAB2 kit, California, USA), washed again in PBS and incubated with streptavidin-peroxidase complex (Link-DAKO, LSAB2 kit, California, USA) for 20 min at room temperature. The reaction was developed with 0.024% diaminobenzidine (DAB; Sigma, St Louis, USA) and 0.16% hydrogen peroxide (40 v/v). Finally, the slides were dehydrated, cleared, counter-stained with Harris's hematoxylin and mounted with coverslips [30].

The skin tissue parasite loads were analyzed by the presence of immunolabeled amastigote forms of *Leishmania* associated with the chronic inflammatory reaction in the dermis. A semi-quantitative study was carried out by optical microscopy (110×). Parasite load was measured as: (+) discrete, (+) moderate and (+++) intense.

Polymerase chain reaction (PCR)

Initially, the samples were washed in ethanol then xylol to dissolve the paraffin, then DNA was extracted from a skin specimen measuring approximately 1.0 mm³ by soaking in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) and incubating with proteinase K (Life Technologies, USA) at a final concentration of 100 µg/ml for 3 h at 56°C. The proteinase was inactivated by heating at 100°C for 15 min. The lysates obtained were processed using a Wizard™ Genomic Purification Kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Two primers were used to amplify a specimen of the conserved region of *Leishmania* kDNA minicircles (5'-GGG [G/T]AGGGGCGTTCT [G/C]CGAA-3' and 5'- [G/C] [G/C] [G/C] (A/T)CTAT [A/T]TTACACCAACCCC-3'). A 120-base pair (bp) PCR product was generated (Degraeve et al., 1994). Reactions were carried out in volumes of 10 µl containing 1.0 µg of DNA, 0.2 mM dNTPs, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 pmol of each primer and 1 U *Taq* polymerase. The conditions for PCR amplification were as follows: initial denaturation at

94°C for 5 min, 30 cycles consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 65°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 5 min. The reaction mixtures were cycled in a Perkin-Elmer GenAmp 9600 thermocycler. In all assays, a positive control containing *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46 strain) genomic DNA and a negative control without DNA were included. Following amplification, the samples were submitted to electrophoresis on 6% polyacrylamide gel and silver-stained. The DNA of bacteriophage φX 174 cleaved by HAE III was used as a molecular marker (Pharmacia, Upsala, Sweden).

Statistical analysis

Descriptive analysis were applied for histological and parasite load results. Inference analysis was carried out by chi-square test (software SPSS 1.1 Windows version) for the three methods (HE, IHC and PCR) and the different skin anatomical regions studied. A *p* value of less than 0.05 was considered significant. As a measure of agreement, index Kappa (κ) was also evaluated between PCR × IHC, PCR × HE and HE × IHC. We accepted κ < 0.4 as weak agreement, 0.7 > κ > 0.4 as good agreement and κ > 0.7 as optimal agreement. The sensitivity of the test was determined using optical microscopy (OM) as the gold standard [23].

Authors' contributions

SCX, IMC, WGL and WLT: Carried out the skin necropsies, histopathology and immunocytochemistry

HMA and SJHM: Carried out the PCR and all the statistical analysis

MSMM: Carried out the serological tests [CRF, ELISA, IFAT, TRALd] for *Leishmania* infection

HMA, WLT and WLT have made substantial contributions to conception and design, analysis and interpretation of data

Acknowledgements

We thank the Zoonosis Control Center of the municipality of Belo Horizonte and Sabará, Minas Gerais, Brazil, for the kind donation of the study animals. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais [FAPEMIG grant CDS2263/97] and Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa Tecnológica e Científica – [grant CNPq 472287/01-0 – NV], Brazil.

References

1. Abranches P, Silva MC-Pereira, 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. Abranches P, Campino L, Santos-Gomes GM: **(Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis).** *Acta Med Port* 1998, **11**:871-5.

3. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J: **Canine leishmaniasis.** *Adv Parasitol* 2004, **57**:1-88.
4. Andrade HM, de Toledo Vde P, Marques MJ, Franca Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W, Genaro O: **Leishmania (Leishmania) chagasi is not vertically transmitted in dogs.** *Vet Parasitol* 2002, **103**:71-81.
5. Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker RH Jr, Badaro R, David JR: **Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis.** *Am J Trop Med Hyg* 1995, **53**:251-5.
6. 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.
7. Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG: **Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:775-9.
8. Degraive W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U: **Use of molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania – a mini-review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994, **89**:463-9.
9. Enserink M: **Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.?** *Science* 2000, **290**:1881-3.
10. Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D: **Identification of Leishmania donovani amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining.** *Res Vet Sci* 1988, **44**:194-6.
11. Grimaldi G Jr, Tesh RB: **Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research.** *Clin Microbiol Rev* 1993, **6**:230-50.
12. Herwaldt BL: **Leishmaniasis.** *Lancet* 1999, **354**:1191-9.
13. Houghton RL, Petrescu M, Benson DR, Skeiky YA, Scalone A, Badaro R, Reed SG, Gradoni L: **A cloned antigen (recombinant K39) of Leishmania chagasi diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type I patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy.** *J Infect Dis* 1998, **177**:1339-44.
14. 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.
15. Livni N, Abramowitz A, Londner M, Okon E, Morag A: **Immunoperoxidase method of identification of Leishmania in routinely prepared histological sections.** *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983, **401**:147-51.
16. Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J: **Diagnosis of Leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work.** *Am J Trop Med Hyg* 1993, **49**:348-56.
17. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S: **Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988, **82**:566-7.
18. Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE: **Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis.** *Vet Parasitol* 2004, **125**:251-62.
19. Mathis A, Deplazes P: **PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmania spp. in diagnostic samples from humans and dogs.** *J Clin Microbiol* 1995, **33**:1145-9.
20. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA: **The strange case of Leishmania chagasi.** *Parasitol Today* 2000, **16**:188-9.
21. Pearson RD, Sousa AQ: **Clinical spectrum of Leishmaniasis.** *Clin Infect Dis* 1996, **22**:1-13.
22. Reithinger R, Davies CR: **Is the domestic dog (Canis familiaris) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **61**:530-41.
23. Sampaio IBM: **Estatística aplicada à experimentação animal.** 1st edition. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária; 1998.
24. Schnur L, Jacobson RL: **Parasitological techniques.** In *The leishmaniasis in biology and medicine/clinical aspects and control* New York: Academic Press; 1987.
25. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L: **Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**:560-3.
26. 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.
27. Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G: **Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of Leishmania infantum DNA in dogs.** *J Infect Dis* 2004, **189**:1729-33.
28. Sundar S, Pai K, Sahu M, Kumar V, Murray HW: **Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis.** *Ann Trop Med Parasitol* 2002, **96**:19-23.
29. Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN: **Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil.** *Vet Parasitol* 2001, **96**:203-12.
30. Tafuri WL, Santos Rde L, 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.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp





Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes

Wanderson Geraldo Lima^a, Marilene Suzan Marques Michalick^b,
Maria Norma de Melo^b, Washington Luiz Tafuri^a, Wagner Luiz Tafuri^{a,*}

^a Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG),
Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte MG31270-901, Brazil

^b de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG),
Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, Belo Horizonte MG31270-901, Brazil

Received 15 March 2003; received in revised form 3 March 2004; accepted 6 April 2004

Abstract

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a zoonosis and a chronic systemic disease of the dog caused by a protozoan of the genus *Leishmania*. In the New World, the disease is caused by the species *Leishmania (Leishmania) chagasi*. There are only a few studies on the histopathology of lymph nodes in canine leishmaniasis. In the present paper, we report a histopathological description of lymph nodes considering animals with a defined clinical status and the parasite burden of lymph node tissues. Forty-eight mongrel dogs naturally infected with *L. chagasi*, were obtained from two endemic areas of Brazil. Cervical, axillary and popliteal lymph nodes were analyzed. The parasite burden, expressed as “Leishman–Donovan units”, was variable among the defined types of clinical condition. Asymptomatic dogs can show higher parasitism than oligosymptomatic or symptomatic animals. Grossly, a generalized lymphadenopathy was found, but it was mainly observed in cervical and popliteal nodes. Histologically, the increased number and size of lymphoid follicles, and the marked hypertrophy and hyperplasia of medullary macrophages (cords and sinus) explained the lymphadenopathy. In addition, the clinical status or the tissue parasitism load might not be directly related to the intensity of the lesions.

Published by Elsevier B.V.

Keywords: Histopathology; *Leishmania chagasi*; Lymph nodes; Dogs; Lymphadenopathy

1. Introduction

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a severe systemic disease of dogs caused by a protozoan of

the genus *Leishmania*. In Latin America, the dog is considered to be the principal domestic reservoir host for human visceral leishmaniasis (VL) caused by infection with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. VL is known from at least a dozen Latin American countries, with 90% of human cases reported from Brazil, especially the northeastern region. In the New World, *Leishmania* is transmitted to man and animals

* Corresponding author. Tel.: +55-31-3499-2889;
fax: +55-31-3499-2879.

E-mail address: wagner@icb.ufmg.br (Wagner L. Tafuri).

by blood-sucking sandflies of the species *Lutzomyia longipalpis* (Lainson and Shaw, 1978; Grimaldi et al., 1989; Ashford, 2000).

In Brazil, VL is highly endemic in the economically depressed semiarid northeastern states of Ceará, Bahia, Maranhão, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte and Paraíba. In all states, there is an association between infected dogs and the abundance of *L. longipalpis* (Deane and Deane, 1962; Cunha et al., 1995; Ashford et al., 1998). Cunha et al. (1995) and Ashford et al. (1998) found an association between human infection and the presence of infected dogs in or near residences in the State of Bahia (Brazil). Furthermore, VL appears to be spreading further in Brazil, and outbreaks have recently been reported in regions where the disease was previously unknown, e.g. in the City of Belo Horizonte, MG (Genaro et al., 1988; Michalick, 1993). Moreover, particularly alarming is the resurgence of epidemic VL in major Brazilian cities such as Teresina (PI), São Luiz (Maranhão), Fortaleza (Ceará) and Rio de Janeiro (RJ) (Marzochi et al., 1994). These urban or predominantly peri-urban outbreaks among satellite slums appear to be increasing, but are cyclical and recurrent after an interval of several years of low endemicity.

Although CVL is acknowledged as a severe disease of dogs, there are few studies describing a systematical histopathological picture of lymph nodes of dogs naturally infected with *L. chagasi*. However, classical histopathological lesions have been described mainly in organs rich in cells of the mononuclear-phagocytic system such as liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow, gastrointestinal tract and skin. In general, an intense chronic inflammatory reaction consisting of mononuclear cells (macrophages, plasmacytes and lymphocytes) is observed in liver, spleen (Anosa and Idowu, 1983; Keenan et al., 1984; Tafuri et al., 1996; Tafuri et al., 2001), skin (Ferrer, 1988; Tafuri et al., 2001), bone-marrow (Tafuri et al., 2001), lymph nodes (Tafuri et al., 1997; Martinez-Moreno et al., 1993) and gastrointestinal tract (González et al., 1990; Ferrer et al., 1991; Silva et al., 2002). Other organs such as lungs and kidneys could be affected, with the occurrence of a chronic interstitial pneumonitis (Tryphonas et al., 1977; Duarte et al., 1986; Gonçalves et al., 2003) and glomerulonephritis with or without nephrotic syndrome (Tafuri et al., 1989;

Nieto et al., 1992), respectively. In addition, granuloma formation has been mainly described in the liver and spleen (Anosa and Idowu, 1983; Tafuri et al., 1996).

The aim of the present study was to describe a systematical histopathological picture of cervical, axillary and popliteal lymph nodes of dogs naturally infected with *L. chagasi*. Dogs with a defined parasitological and clinical status were obtained from two distinct endemic areas of Brazil, i.e., João Pessoa City, PB (Brazil northeast) and Belo Horizonte City, MG (Brazil southeast).

2. Material and methods

2.1. Animals

Forty-eight mongrel dogs of unknown age naturally infected with *L. (Leishmania) chagasi* were identified during an epidemiological survey of canine visceral leishmaniasis carried out by the City Hall (Zoonosis Department) of João Pessoa, PB (Brazil Northeast) and of Belo Horizonte, MG (Brazil Southeast). The tests used were indirect immunofluorescence antibody titres (IFAT), complement fixation reaction (CFR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Andrade et al., 2002). Immunofluorescent titres (>1:40 dilutions), CFR (>1:40 dilutions) and ELISA (optical density >100; >1:400 dilutions) were positive for all animals. In addition, we used a test with a commercial kit containing an immunochromatographic strip that uses recombinant leishmanial antigen k39; a dominant amastigote antigen of *L. chagasi* (rK39), which is highly sensitive and specific for *L. donovani* complex infection, as previously described (Houghton et al., 1988; Burns et al., 1993; Sundar et al., 2002). Sera from all infected dogs were positive for this test also.

Animals were divided into three groups: Group I consisted of 18 naturally infected animals from João Pessoa, PB; Group II consisted of 30 naturally infected animals from Belo Horizonte, MG; and Group III of five uninfected animals (control animals) – two from João Pessoa, PB, and three from Belo Horizonte, MG. These control animals were serologically and parasitologically negative for *Leishmania*.

Table 1
Naturally infected animals and uninfected animals (controls) from Belo Horizonte, MG and João Pessoa, PB, Brazil

Animal clinical status	Group I (João Pessoa-infected dogs) (<i>n</i>)	Group II (Belo Horizonte-infected dogs) (<i>n</i>)	Group III (control animals) (<i>n</i>)
Symptomatic	6	10	–
Oligosymptomatic	6	10	–
Asymptomatic	6	10	–
Total number of animals	18	30	5

2.2. Clinical aspects of infected dogs

All infected dogs were clinically classified according to a previously reported study (Mancianti et al., 1998) as follows:

- Symptomatic dogs – animals that exhibited the classical signs of the disease such as cutaneous alterations (alopecia, dry exfoliative dermatitis or ulcers), onychogryphosis, keratoconjunctivitis, cachexia and anemia.
- Oligosymptomatic dogs – animals exhibiting some clinical signs of the disease and/or lesions such as lymphoid adenopathy, moderate weight loss and/or dull brittle hair accompanied by cutaneous lesions.
- Asymptomatic dogs – apparently healthy animals.

Animals from João Pessoa (PB) were divided into three groups of six symptomatic, six oligosymptomatic and six asymptomatic dogs. Animals from Belo Horizonte (MG) were divided into three groups of 10 symptomatic, 10 oligosymptomatic and 10 asymptomatic dogs as shown in Table 1.

2.3. Parasitological diagnosis of *Leishmania* infection

Parasitological diagnosis was carried out to confirm the serological diagnosis of visceral leishmaniasis. During the necropsy as following described, fragments of livers and spleens of all dogs were collected for histopathology analysis. Amastigotes forms of *Leishmania* could be observed inside macrophages of livers and spleens of all animals.

2.4. Histopathology

Dogs were sacrificed with a lethal dose of 33% Thiopental® (intravenous). Samples of cervical, ax-

illary and popliteal lymph nodes were collected and fixed in 10% neutral buffered formalin solution. All tissue samples were dehydrated, cleared, embedded in paraffin, cut into 4–5 µm thick sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

2.5. Parasite burden

Small samples of cervical, axillary and popliteal lymph nodes were obtained to prepare tissue touch preparations (smears). The smears were air-dried and Giemsa-stained. The presence of *Leishmania* amastigotes was detected in all animals by light microscopy using immersion oil (objective 100×).

The lymph node parasite burden was expressed as *Leishman–Donovan units* (LDU) (Stauber, 1956). LDU was determined by microscopic enumeration of *Leishmania* amastigotes divided by 1000 cell nuclei and the result was multiplied by the organ weight.

$$\left(\text{LDU} = \frac{\text{Number of amastigotes}}{1000 \text{ cell nuclei}} \times \text{lymph node weight} \right)$$

2.6. Statistical analysis

The software Instat for Windows was used for the descriptive analysis and inferences. LDU data and histological results were analyzed statistically by the non-parametric Kruskal–Wallis test (Sampaio, 1998).

3. Results

3.1. Clinical aspects

The main clinical features of all animals are presented in Table 2. Skin abnormalities are the most

Table 2

Clinical features of naturally infected dogs from Belo Horizonte, MG and João Pessoa, PB, Brazil

Clinical features	Belo Horizonte-infected dogs number (%)	João Pessoa-infected dogs number (%)
Lymphadenopathy (cervical lymph node)	11 (55)	4 (33)
Lymphadenopathy (axillary lymph node)	8 (40)	3 (25)
Lymphadenopathy (popliteal lymph node)	10 (50)	5 (42)
Alopecia	6 (30)	1 (08)
Dry desquamation	5 (25)	2 (17)
Onychogryphosis	13 (65)	8 (67)
Skin ulceration	14 (70)	10 (83)
Cachexia	8 (40)	3 (25)
Anemia	9 (45)	2 (17)

usual manifestation of CVL. The most frequent clinical sign was a chronic ulceration mainly localized on the ears and limbs followed by onychogryphosis and dry desquamation. However, a generalized lymphadenopathy was observed involving the three lymph nodes. Higher indices of lymphadenopathy were found for dogs from Belo Horizonte, MG.

3.2. Anatomical pathology

In general, the lymph nodes of all naturally infected animals showed chronic lymphadenitis involving the entire architecture of the nodes including the capsule, subcapsular sinus, cortical (lymphatic nodules and paracortex) and medullary regions (medullary sinus and medullary cords). However, there were no specific lymph node lesions for asymptomatic, oligosymptomatic or symptomatic animals. Thus, animals from both Brazilian cities presented the same histological

picture. The histopathological changes of the lymph nodes are summarized in Table 3.

3.3. Macroscopical analysis

In general, the gross examination showed that all lymph nodes, especially the cervical nodes of all infected dogs, were moist, bulging above the cut surface, turgid, of firm consistency, but containing no necrotic areas.

3.4. Microscopic analysis

The histological results are described below according to node architecture.

3.4.1. Capsule

In the majority of the cases (89–96%), the capsule of lymph nodes was thickened and colonized by a chronic

Table 3

Histopathological features of lymph nodes of naturally infected dogs from Belo Horizonte, MG and João Pessoa, PB, Brazil

Histopathological features	Naturally infected dogs (%)	
	Belo Horizonte (<i>n</i> = 30) (%)	João Pessoa (<i>n</i> = 18) (%)
Thickened capsule with chronic inflammation	89	96
Inflammatory reaction in the subcapsular sinus	91	92
Cortical follicular hyperplasia	82	84
Hypertrophy and hyperplasia of macrophages of the medullary sinus	100	100
Hypertrophy and hyperplasia of macrophages of the medullary cords	98	100
Congestion	16	16
Hemosiderosis	79	46
Presence of <i>Leishmania</i>	58	54

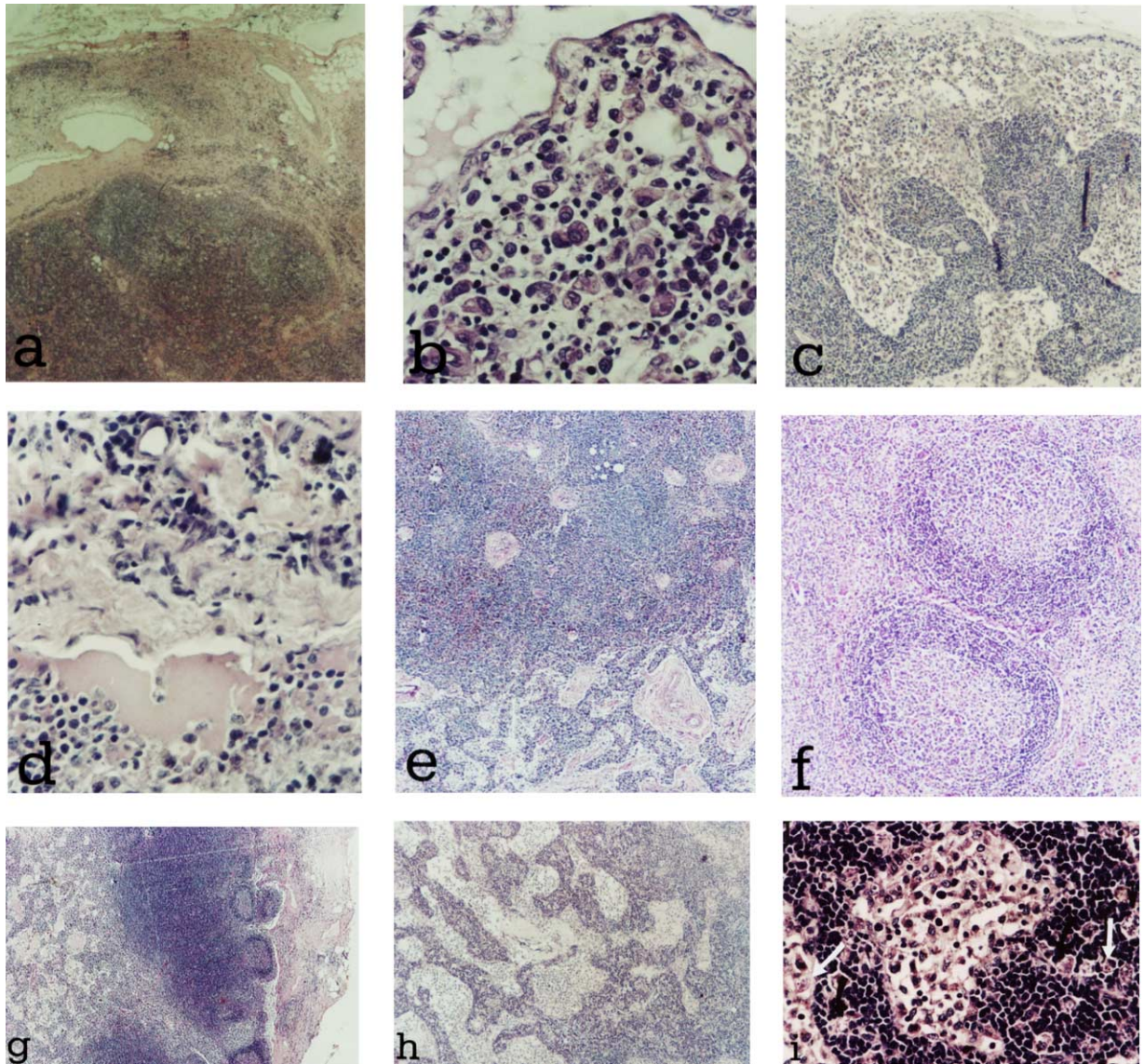


Fig. 1. Cervical lymph node – H&E: (a) The capsule is thickened and colonized by a chronic inflammatory reaction. Magnification 40×. (b) Inflammatory macrophages showing the “parasitophorous vacuoles” containing *Leishmania* amastigotes. Magnification 440×. (c) Inflammatory reaction in the subcapsular sinus. Magnification 110×. (d) Edema was observed in the sinus as a liquid eosinophilic amorphous deposition. Magnification 440×. (e) Lymphoid tissue moving irregularly into the medullary area of the node. Magnification 40×. (f) Germinal centers showing dark and clear zones. Magnification 110×. (g) Diffuse paracortical hyperplasia could be seen in some cases, as shown. Note an intense inflammatory reaction in the capsule. Magnification 110×. (h) Hypertrophy and hyperplasia of medullary cords and sinus of the node. Magnification 40×. (i) Note cords and sinus macrophages loaded with *Leishmania* amastigotes (white arrows). Magnification 400×.

inflammatory mononuclear cell exudate associated to a collagen tissue deposition (Fig. 1a). Macrophages were the main inflammatory cells. Macrophages often presented intracytoplasmatic vacuoles containing amastigotes forms of *Leishmania* (“parasitophorous vacuoles”) (Fig. 1b).

3.4.2. Subcapsular sinus

More than 90% of cases showed an inflammatory reaction in the subcapsular sinus (Fig. 1c). Edema could be found in some cases, as shown in Fig. 1(d).

3.4.3. Cortical region

Histologically, the lymph nodes, especially the superficial cervical and popliteal nodes, showed follicular hyperplasia. Germinal centers became contiguous in the outer cortex and moved irregularly into the medullary areas of the node (Fig. 1e). Cells with large nuclei, branched chromatin and prominent nucleoli (clear zone) delimited by medium-sized lymphocytes (dark zone) characterized the germinal centers (Fig. 1f). A diffuse paracortical hyperplasia could be observed in some cases, but was not a marked histological alteration (Fig. 1g). Hyperplasia with a typical “starry sky” effect was observed only in some cases.

No amastigote forms of *Leishmania* were observed in the cortical or paracortical region of the lymph nodes in any of the animals.

3.4.4. Medullar

Hypertrophy and hyperplasia of medullary cords and sinus cells occurred in all cases. The medullary areas were closely packed with differentiated plasma cells, medium-sized and large lymphocytes (lymphoblasts), and macrophages. However, the hypertrophy and hyperplasia of macrophages was a conspicuous alteration of the cords and sinus. Macrophages were morphologically differentiated as “epithelioid cells” on account of their large, vesicular nuclei, branched chromatin and abundant cytoplasm (Fig. 1h and i).

Small granules of hemosiderin pigments were often observed inside macrophages of the medullary cords and sinus. Edema was irregularly observed and was found in cords and sinus areas as an eosinophilic and amorphous extracellular tissue fluid. In some cases, there was proliferation of the collagenous septa of the medulla, and extensive displacement of the medullary

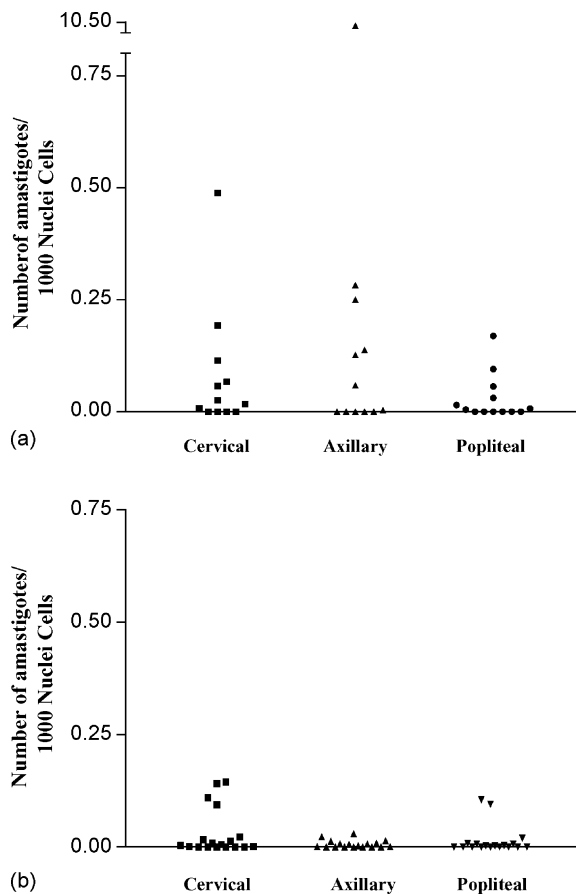


Fig. 2. (a) LDU Belo Horizonte-infected dogs; (b) LDU João Pessoa-infected dogs.

cords and plasma cells was often observed simultaneously. An intense parasitism was frequently observed in this area. Thus, amastigotes forms of *Leishmania* were easily found inside macrophages of the medullary cords and sinus (Fig. 1i).

It is important to say that none of the control animals showed marked anatomical or histological alterations. Generalized or localized lymphadenopathy was not observed in any case.

3.5. Tissue parasitism

The LDU results are depicted in Fig. 2(a) and (b). Statistical analysis of LDU data did not show any difference in parasite burden among cervical, axillary and popliteal lymph nodes, even considering

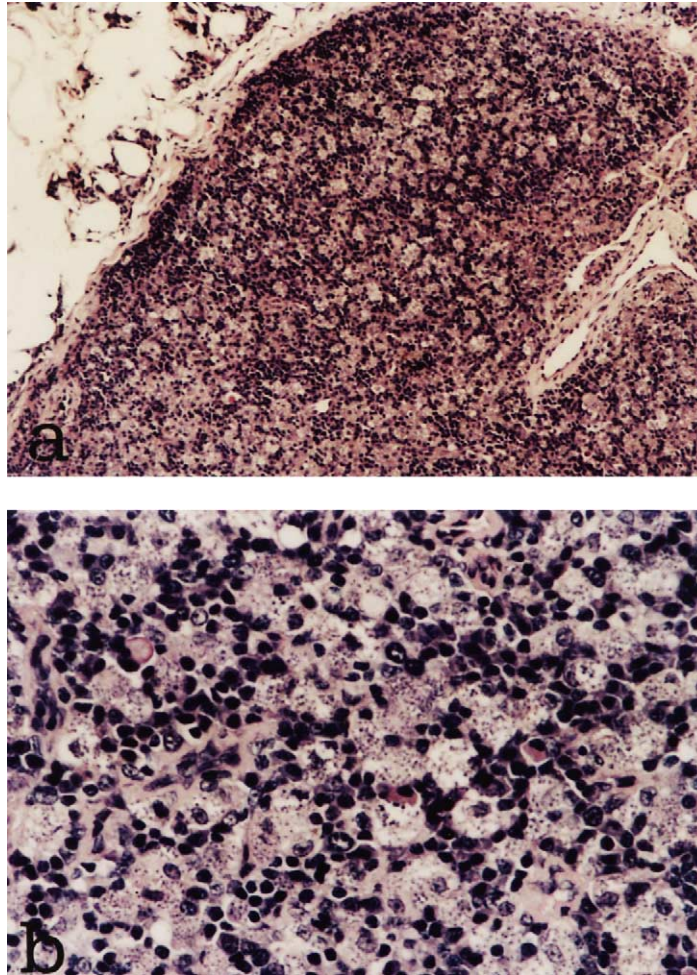


Fig. 3. Popliteal lymph nodes. (a) Follicular and lymphoid structures replaced by a proliferation of macrophages. Magnification 40 \times . (b) Observe innumerable macrophages diffusely distributed and loaded with *Leishmania* amastigotes. Magnification 400 \times .

the defined clinical status of the animals and/or their geographic origin. However, the tissue parasitism (LDU) was variable. Some cases of asymptomatic or oligosymptomatic dogs showed higher LDU numbers than symptomatic dogs. Indeed, there were two asymptomatic dogs with an intense parasitism in the nodes. Histologically, the parasitism was quite intense, affecting the entire lymph node architecture. The histological analysis of all three lymph nodes showed lymphocytes and follicular structures replaced or obscured by proliferation of histiocytes (macrophages). Macrophages were intensely parasitized by innumerable intracytoplasmic amastigotes forms of *Leishmania* (Fig. 3a and b).

4. Discussion

As also observed in the Old World (Pinelli et al., 1994; Ciaramella et al., 1997; Ferrer, 1999), symptomatic CVL due to *L. (Leishmania) chagasi* in America presents clinically with anemia, emaciation, splenomegaly, local or generalized lymphadenopathy, cutaneous lesions, ocular lesions, weight loss and cachexia. In the present study, we found dermatological entities previously described by Ferrer (1988) and Ciaramella et al. (1997). Dry desquamation was observed associated with alopecia usually starting on the head (mainly ears and eyes-orbital) and extending to the rest of the body (Ferrer, 1988; Ciaramella

et al., 1997). In this work, the skin lesions were observed in the majority of the animals, whereas lymphadenopathy was detected in less than 55% of the dogs (Table 2). Thus, according to the literature, we can conclude that skin lesions were a more important clinical sign than lymphadenopathy.

In CVL, lymphadenopathy is also a common clinical sign of the disease. Lymphadenopathy is usually defined as an increase in lymph node size (enlargement of lymph nodes) and it could appear as a regional or generalized alteration (Rogers et al., 1993). In the present study, we found a generalized enlargement of lymph nodes, especially the cervical nodes. Moreover, infected animals from Belo Horizonte, MG, showed higher indices of cervical lymphadenopathy. The gross pathological picture of the cervical lymph nodes was more prominent than that of the other nodes. This result seems to agree with previous data described by Ciaramella et al. (1997) in Italy. The cited paper referred that cervical lymph nodes are more reactive because of their anatomical position. Indeed, the drainage afferent system of cervical lymph nodes involves the skin and subcutis of the caudal regions of the head and auricle (Rogers et al., 1993). These ideas are understandable if we consider that *Leishmania* is transmitted to animals by blood-sucking sandflies that mainly bite dogs on the ears and nose (Abranches et al., 1998).

Enlarged soft lymph nodes with areas of necrosis are observed in acute lymphadenitis, whereas enlarged hard or indurated lymph nodes with neoplasia (lymphomas), granulomas and/or caseocalcareous nodules are observed in chronic lymphadenitis (Rogers et al., 1993). However, the generalized enlargement of lymph nodes observed in infected dogs showed a distinct gross picture. The lymph nodes, especially the cervical ones, were hard, moist and bulged above the cut surface with distinctive white areas easily recognized as “reactive cortical region areas”. In fact, this was confirmed by the histological picture described for the cortical lymph node region. On the other hand, acute suppurative lymphadenitis, granuloma or pyogranuloma formation and/or nodal fibrosis were not found in any case.

In the present study, all lymph nodes of infected animals showed chronic lymphadenitis. The histopathological picture was similar for all cases

independently of lymph node anatomical region or animal's geographical origin. Despite the presence of diffuse chronic inflammation involving the capsule throughout the medullary zones, the hypertrophy and hyperplasia of cortical and medullary zones were a common feature. However, in the majority of the observed dogs, the essential architecture of the lymph nodes was preserved without atrophic or degenerative areas. These alterations explain the enlargement of the lymph nodes, whereas hyperemia and edema were irregularly present and thus cannot explain the enlargement of the nodes.

Despite the fact that there were no statistical differences between animals symptomatic or asymptomatic, it is possible to find asymptomatic dogs more parasitized than symptomatic ones. In fact, two asymptomatic animals from Belo Horizonte, MG, showed a conspicuous histopathological picture characterized by intense parasitism, with disruption of the architecture of the cervical, axillary and popliteal lymph nodes. There was a depletion of lymphocytes and follicular structures replaced mainly by macrophages loaded with amastigotes forms of *Leishmania*. Depletion of T lymphocytes dependent on lymphoid organs associated with plasma cell and macrophage proliferation has been reported in human visceral leishmaniasis (Veress et al., 1977), in hamsters experimentally infected with *L. chagasi* (Corbett et al., 1992), in dogs experimentally infected with *L. chagasi* and *L. donovani* (Keenan et al., 1984) and in dogs naturally infected with *L. infantum* (Martinez-Moreno et al., 1993). It is important to say that these two asymptomatic animals did not show any macroscopic lesions during the clinical or anatomopathological examination after necropsy. Thus, the histopathological picture observed in all three lymph nodes was an unsuspected feature. These results indicate that asymptomatic dogs can have parasites in all anatomical lymph node locations. This fact enhances the importance of asymptomatic dogs in the epidemiology of visceral leishmaniasis as discussed by Abranches et al. (1998) in Portugal.

The disruption of the architecture of the cervical, axillary and popliteal lymph nodes of these two asymptomatic animals was an exception considering all the others cases. In general, the architecture of the lymph nodes was preserved in the majority of the infected dogs in this work.

There are only a few studies on the histopathology of lymph nodes in canine leishmaniasis (Keenan et al., 1984; Martinez-Moreno et al., 1993; Tafuri et al., 2001). Generalized lymphadenopathy was a classical clinical feature, but less frequent than dermatological lesions. However, two basic mechanisms (histologically observed) explain the lymphadenopathy in CVL. First, there is an increased number and size of lymphoid follicles, with proliferation of lymphocytes and reticuloendothelial cells (immune response), and second, a marked hypertrophy and hyperplasia of medullary macrophages (cords and sinus). In addition, the clinical status or the tissue

parasitism load might not be directly related to the intensity of the lesions.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG grant CDS2263/97) and Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pesquisa Tecnológica e Científica (grant CNPq 472287/01-0-NV), Brazil. We thank Professor Marcia Rosa de Oliveira from Universidade Federal da Paraíba, Departamento Biologia Molecular e Genética, João Pessoa, PB, Brazil.

Appendix A

Leishman–Donovan units (LDU) – absolute numbers naturally infected animals from Belo Horizonte, MG and João Pessoa, PB, Brazil.

Belo Horizonte			João Pessoa		
Cervical	Axillary	Popliteal	Cervical	Axillary	Popliteal
0.000	0.000	0.000	0.145	0.003	0.000
0.212	0.201	0.000	0.006	0.030	0.003
0.819	0.561	0.251	0.001	0.007	0.006
0.000	0.000	0.000	0.001	0.006	0.006
0.000	0.092	0.000	0.000	0.001	0.000
0.000	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000
0.000	0.006	0.000	0.004	0.000	0.001
0.000	0.000	0.000	0.095	0.013	0.095
0.005	0.104	0.000	0.009	0.000	0.000
0.118	0.095	0.000	0.014	0.009	0.020
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.097	0.150	10.436	0.142	0.000	0.105
0.315	0.021	0.489	0.016	0.022	0.000
0.396	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
0.142	0.138	0.193	0.009	0.006	0.000
0.015	0.021	0.008	0.000	0.014	0.000
0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.001
0.120	0.000	0.004	0.110	0.001	0.003
0.000	0.000	0.057			
0.062	0.000	0.058			
0.043	0.000	0.017			
0.068	0.202	0.026			
0.000	0.028	0.007			
0.071	0.043	0.000			
0.000	0.044	0.000			
0.186	0.227	0.096			
0.550	0.571	0.000			
0.219	0.000	0.127			

Appendix A (Continued)

	Belo Horizonte			João Pessoa		
	Cervical	Axillary	Popliteal	Cervical	Axillary	Popliteal
	0.134	0.022	0.114			
	0.000	0.000	0.000			
	0.065	0.082	0.138			
	0.220	0.000	0.170			
	0.109	0.038	0.015			
	0.014	0.169	0.031			
	0.040	0.043	0.067			
	0.016	0.229	0.059			
	0.015	0.074	0.282			
Media	0.109	0.085	0.342	0.085	0.087	0.076
S.D.	0.172	0.137	1.709	0.051	0.009	0.032

References

- Abranches, P., Campino, L., Santos-Gomes, G.M., 1998. Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controlo da leishmaniose visceral humana. *Acta Médica Portuguesa* 11, 871–875.
- Andrade, H.M., de Toledo, V.P., Marques, M.J., França Silva, J.C., Tafuri, W.L., Mayrink, W., Genaro, O., 2002. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet. Parasitol.* 3, 71–81.
- Anosa, V.O., Idowu, A.L., 1983. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. *Zbl. Vet. Med. B* 30, 600–608.
- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269–1281.
- Ashford, D.A., David, J.R., Freire, M., David, J.R., Sherlock, I., da Conceição Eulalio, M., Pedral Sampaio, D., Badaro, R., 1998. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 53–57.
- Burns Jr., J.M., Shreffler, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaro, R., Reed, S.G., 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 775–779.
- Ciaramella, P., Oliva, G., Lura, P.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. A* 141, 539–543.
- Corbett, C.E.P., Pinto Paes, R.A., Laurenti, M.D., Andrade, Jr., Duarte, M.I.S., 1992. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. *Inst. J. Exp. Pathol.* 73, 417–433.
- Cunha, S., Freire, M., Eulalio, C., Cristovão, J., Nello, E., Johnson Jr., W.D., Reed, S.G., Badaro, R., 1995. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 155–158.
- Deane, L.M., Deane, M.P., 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop.* 4, 198–212.
- Duarte, M.I.S., Laurenti, M.D., Brandao Nunes, V.L., Rego Junior, A.F., Oshiro, E.T., Corbett, C.E., 1986. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 28, 431–436.
- Ferrer, L., 1988. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.* 29, 381–388.
- Ferrer, L., 1999. Clinical aspects of canine leishmaniasis, in: International Canine Leishmaniasis Forum. Proceedings of the Barcelona, Barcelona, pp. 6–10.
- Ferrer, L., Juanola, B., Ramos, J.A., 1991. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet. Pathol.* 28, 342–343.
- Genaro, O., Mayrink, W., Michalick, M.S.M., Dias, M., Costa, C.A., Melo, M.N., 1988. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83, 43.
- Gonçalves, R., Tafuri, W.L., Melo, M.N., Raso, P., Tafuri, W.L., 2003. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* – histopathological and morphometrical study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45, 1–12.
- González, J.L., M, L., Garcia, P., 1990. Erosive colitis in experimental canine leishmaniasis. *J. Vet. Med. B* 37, 377–382.
- Grimaldi, G., Tesh, R.B., Mc Mathon-Pratt, D.A., 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 687–725.
- Houghton, R.L., Petrescu, M., Benson, D.R., Skeiky, Y.A., Scalone, A., Badaro, R., Reed, S.G., Gradoni, L., 1988. A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J. Infect. Dis.* 177, 1339–1344.

- Keenan, C.N., Hendricks, L.D., Lightner, L., Johnson, A.J., 1984. Visceral leishmaniasis in a German shepherd dog. II. Pathol. Vet. Pathol. 21, 80–86.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. Nature 273, 595–600.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1998. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Hyg. 82, 566–567.
- Martinez-Moreno, A., Martinez-Cruz, M.S., Hernandez-Rodriguez, S., 1993. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 51, 49–59.
- Marzochi, M.C., Marzoci, K.B.F., Carvalho, R.W., 1994. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. Parasitol. Today 10, 37–40.
- Michalick, M.S.M., 1993. Spreading of visceral leishmaniasis in urban area of Belo Horizonte MG, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 88 (supl. I), 53.
- Nieto, C.G., Navarrete, I., Habela, M.A., Serrano, E.F., Redondo, E., 1992. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. Vet. Parasitol. 45, 33–47.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagennar, J., Bernadina, W., Real, G., Ruitenberg, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect. Immun. 62, 229–235.
- Rogers, K.S., Barton, C.L., Landis, M., 1993. Canine and feline lymph nodes. Part II. Diagnosis, evaluation and lymphadenopathy. Compendium 15, 1493–1501.
- Sampaio, I.B.M., 1998. Estatística aplicada a experimentação animal/Ivan Barbosa Machado Sampaio – Belo Horizonte, MG, Brasil. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 221 p.
- Silva, F.L., Tafuri, W.L., Oliveira, M.R., Tafuri, W.G.L., 2002. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Arq. Bras. Med. Vet. Zoo. 54, 340–344.
- Stauber, L.A., 1956. Host Resistance to the Kharthoum Strain of *Leishmania donovani*, vol. 45. The Rice Institute Pamphlet, pp. 80–96.
- Sundar, S., Pai, K., Sahu, M., Kumar, V., Murray, H.W., 2002. Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. Ann. Trop. Med Parasitol. 1, 19–23.
- Tafuri, W.L., Michalick, M.S., Dias, M., Genaro, O., Leite, V.H., Barbosa, A.J., Bambilra, E.A., Da Costa, C.A., Melo, M.N., Mayrink, W., 1989. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 3, 139–145.
- Tafuri, W.L., Michalick, M.S.M., Genaro, O., Silva, J.C.F., Nascimento, E., 1997. Canine visceral leishmaniasis: immunocytochemical study of the MHC class II antigens in liver and lymphoid organs. Arq. Bras. Med. Vet. Zoo. 49, 673–684.
- Tafuri, W.L., De Oliveira, M.R., Melo, M.N., Tafuri, W.L., 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. Vet. Parasitol. 3, 203–212.
- Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., Barbosa, A.J.A., Michalick, M.S., Genaro, O., Franca-Silva, J.C., Mayrink, W., Nascimento, E., 1996. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Rev. Inst. Med. Trop. 38, 81–89.
- Tryphonas, L., Zawdzka, Z., Bernard, M.A., Janzen, E.A., 1977. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical hematological and pathological observations. Can. J. Comp. Med. 41, 1–12.
- Veress, B., Omer, A., Satir, A.A., El Hassan, A.M., 1977. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. Immunology 33, 605–610.

Canine visceral Leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

[*Leishmaniose Visceral Canina: um caso inusitado de um animal assintomático proveniente de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*]

S.C. Xavier¹, I.M. Chiarelli¹, W.G. Lima², R. Gonçalves¹, W.L. Tafuri²

¹Escola de Veterinária - UFMG

²Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Caixa Postal 486

31270-901 - Belo Horizonte, MG

ABSTRACT

A remarkable histopathological picture of one asymptomatic dog naturally infected with *Leishmania infantum* (*syn. chagasi*) has been presented. Intracellular parasites were easily found in macrophages of all exanimate organs, especially in skin. Embedded paraffin tissues of liver, spleen, axillary and popliteal lymph nodes, and skin (ear, muzzle and abdomen) are stained by hematoxylin and eosin and by immunocytochemical reaction (streptavidin-peroxidase method) to detect parasites. All organs showed an intense parasitism associated with severe pathological changes. All lymph nodes had conspicuous histological architecture alterations. Lymphocytes were replaced by macrophages stuffed with an intense number of amastigote forms of *Leishmania*. The lymphoid nodules (without germinal centers) and the mantle zones in the cortex that surround the follicles were markedly attenuated. Livers showed small intralobular granulomas composed by macrophages loaded with amastigotes. Spleens had an intense depression of the white pulp whereas the lymphocytes were replaced by parasitized macrophages. All fragments of different anatomical regions of skin (ear, muzzle and abdomen) showed a diffuse chronic inflammation. The cellular exudate was composed by macrophages, plasmacytes and lymphocytes. Macrophages loaded with amastigotes were easily found in all tissue fragments, but more intense in ear and muzzle. Thus, this fact enhances the importance of asymptomatic dogs in the epidemiology of visceral leishmaniasis.

Keywords: dog, *Leishmania infantum*, histopathology

RESUMO

Relata-se um quadro histológico caracterizado por lesões acentuadas em tecidos de um cão assintomático naturalmente infectado por *Leishmania infantum* (*sin. chagasi*). Cortes parafinados de fígado, baço, linfonodos (cervical, axilar e poplíteo) e pele (orelha, espelho nasal e abdome) foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina e pela técnica imunoistoquímica de estreptavidina-peroxidase para detecção de formas amastigotas de *Leishmania*. Os linfonodos apresentaram profundas alterações estruturais. Em todos observou-se depleção linfocitária, principalmente da córtex, com substituição dos linfócitos por macrófagos abarrotados de formas amastigotas de *Leishmania*. No fígado, observou-se a presença de pequenos granulomas intralobulares compostos por macrófagos intensamente parasitados, plasmócitos e raros linfócitos. No baço, a alteração marcante foi a depressão da polpa branca. Os folículos linfóides foram substituídos por macrófagos intensamente parasitados com as formas amastigotas de *Leishmania*. Fragmentos de pele de orelha, espelho nasal e abdome apresentaram reação inflamatória crônica e difusa com exsudato celular composto por macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Parasitos foram detectados em todos os tecidos estudados e mais numerosos na pele da orelha e focinho. Os achados mostram a importância de cães assintomáticos na epidemiologia da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: cão, *Leishmania infantum*, histopatologia

Recebido em 15 de março de 2005

Aceito em 3 de março de 2006

*Autor para correspondência (Corresponding author)

E-mail: wagner@icb.ufmg.br

Apoio: FAPEMIG (CDS 2263-97; EDT-2124/03) e CNPq (Processo nº 472287/2001)

INTRODUCTION

Human visceral leishmaniasis (HVL) and canine visceral leishmaniasis (CVL) in the New World are caused by intracellular protozoan *Leishmania infantum* (syn. *L.chagasi*) (Maurício et al., 2000) which is transmitted by the bite of an infected phlebotomine *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*. Following injection into the skin, the extracellular promastigote form of the parasite must rapidly enter its host cell, the macrophage, and later transform into the intracellular amastigote form. Visceral leishmaniasis (VL) remains a serious public health problem in the world and dogs (*Canis familiaris*) are the main peridomestic reservoir host (Anderson, 1980; Grimaldi et al., 1989; Tesh, 1995).

In Brazil, VLC is highly endemic in the semiarid northeastern poor states of Ceará, Bahia, Maranhão, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte and Paraíba. In all states there is an association with infected dogs and abundant *L. longipalpis* (Deane and Deane, 1962; Guedes et al., 1978). The CVL appears to be spreading further in Brazil and outbreaks have been reported in metropolitan cities as Belo Horizonte, MG (Genaro et al., 1988; Michalick et al., 1993), Teresina, PI, São Luiz, MA, Fortaleza, CE, Rio de Janeiro RJ (Marzochi et al., 1994) and Salvador, BA (Cunha et al., 1995; Ashford et al., 1998).

The skin is considered the more important tissue reservoir of parasites in healthy and sick *Leishmania*-infected dogs (Abranches et al., 1991; Solano-Gallego et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2004). Thus, the presence of *Leishmania* especially in the skin of dogs without clinical signs enhances the importance of asymptomatic dogs in the epidemiology of visceral leishmaniasis. The present study describes a remarkable pathological picture of one asymptomatic dog naturally infected with *Leishmania infantum*.

MATERIAL E METHODS

An asymptomatic infected mongrel dog was detected by an epidemiological survey of canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), Brazil. This inquire is based on a serological survey of canine population by anti-

antigen (*Leishmania*) indirect immunofluorescence (IFAT), complement fixation reaction (CFR) test (Pellegrino and Brener, 1958) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The animal was considered asymptomatic dog without the classical symptoms of the disease as weight loss, clinical anaemia (pale mucous eye membrane), generalized lymphadenopathy, onychogryphosis and cutaneous lesions (dry exfoliative dermatitis, alopecia and scars).

The parasites were previously classified by *L. infantum* (syn. *chagasi*) to a complex level by PCR using conserved regions of kinetoplastidae and hybridization with kDNA probes to complex (Tafari et al., 2001).

The dog was sacrificed with an overdose of Thiopental sodic (33%, 5ml/kg dose, I.V.). Tissue samples of liver, spleen, cervical, axillary and popliteal lymph nodes and skin (ear, nose and abdomen) were carried out and Giemsa staining was used to visualize amastigotes forms of *Leishmania* by optical microscope using oil immersion (objective 100x).

Samples of liver, spleen, cervical, axillary and popliteal lymph nodes and skin (ear, muzzle and abdomen) were fixed in 10% buffered formalin solution, embedded paraffin sections wires stained with hematoxilin and eosin.

Others paraffin tissue samples (0,5 x 0,5 cm) were stained by biotin-streptoavidin peroxidase immunostaining method to detect amastigotes forms of *Leishmania*. (Silva et al., 2002; Tafari et al., 2004).

RESULTS

During the necropsy no gross important lesions was show in any examined organs. However, under optic microscopical analysis, a conspicuous histopathological picture was observed. It was characterized by an intense parasitism with disruption of the architecture of the cervical, axillary and popliteal lymph nodes. Also, a chronic inflammatory reaction with parasites was noted in all organs, as described as follows.

Liver: a remarkable leishmaniotic chronic granulomatous inflammatory reaction was observed distributed on all tissue sections (Tafuri et al., 1996; Tafuri et al., 2001). In fact, various intralobular granulomas could be noted and they were constituted by macrophages, loaded with amastigotes forms of *Leishmania*, some epithelioid cells, small numbers of lymphocytes, plasmocytes and rare neutrophils. The intralobular granuloma formations, localized in the sinusoid lumen, were very small and rarely confluent. Moreover brown crystals (hemossiderin) were detected chiefly in kupffer cells and in macrophages within granulomas (Fig.1a,b).

Lymph nodes: all lymph nodes (cervical, axillary and popliteal) showed a conspicuous change in its architecture. Lymphocytes were replaced by many macrophages loaded with various amastigotes forms of *Leishmania*. The lymphoid nodules (without germinal centers) and the cortical region were markedly attenuated. In resume, the histological analysis showed lymphocytes and follicular structures replaced or obscured by proliferation of macrophages loaded with amastigotes forms of *Leishmania*. (Figure 2a,b).

Spleen: a dramatic white pulp depletion was observed and lymphocytes were replaced by macrophages loaded with amastigotes. The white pulps were restricted to a few lymphocytes around the central arteriole. The red pulp showed profound distortion due to the marginal macrophage proliferation. Macrophages were organized in granulomas and they were loaded with parasites and with brown crystals of hemossiderin. An intense parasitism was also observed in the thick capsule, subcapsular and trabecular system. (Fig. 3).

Skin: the various skin samples from the ears, muzzle and abdominal regions showed focal chronic inflammation. The cellular exudate was observed around the small vessels and glands appendage in the deep dermis and also diffuses in the upper dermis. The inflammatory cells were macrophages, plasmocytes and lymphocytes. Many amastigotes forms of *Leishmania* could be found inside macrophages in all skin, but the

parasitism was more intense in ears and muzzles skin sections (Fig. 4a,b,c).

DISCUSSION

Classical canine leishmaniasis appears as a chronic wasting disease with anaemia, generalized lymphadenopathy, hepatoesplenomegaly, onychogryphosis and cutaneous lesions (dry exfoliative dermatitis, ulcerations and alopecia). (Slappendel and Greene,1990; Ferrer, 1991; González et al., 1990; Ciaramella et al., 1997). The main histopathological alteration is a hypertrophy and hyperplasia of the monocyte-mononuclear system mostly of spleen, lymph nodes, liver and bone-marrow. Other lesions have been also observed as a chronic dermatitis (Tafuri et al., 1996; Fondevila et al., 1997; Ferrer et al., 1999); granulomatous inflammatory reactions in livers and spleens (Tafuri et al., 1996); interstitial pneumonitis (Duarte et al., 1986; Gonçalves, 2003) and glomerulonephritis with or without nephrotic syndrome (Tafuri et al.,1989; Nieto et al., 1992; Font and Closa, 1997).

Some reports from Mediterranean area have described a high prevalence of infection in dogs, demonstrated by a specific humoral and cellular immunity and leishmanial DNA detection. These investigations demonstrated that in an endemic region there is a large population of *Leishmania*-infected but clinically healthy dogs and a smaller proportion of dogs with clinically patent leishmaniasis (Cabral et al., 1998; Solano-Gallego et al., 2001).

Thus, the histopathological picture observed in this case could be indicated that asymptomatic dogs can have parasites in all superficial lymph nodes and in liver, spleen and skin. This later fact enhances the importance of asymptomatic dogs in the epidemiology chain of visceral leishmaniasis as discussed by Abranches et al. (1998) in Portugal and Solano-Galeno et al. (2004) in Spain. Solano-Galeno et al. (2004) showed that is possible detect sick dogs with normal skin, but harboring parasites as well. Taken together these ideas and this present case, we could say that asymptomatic dogs probably play an important role in the transmission of leishmaniasis.

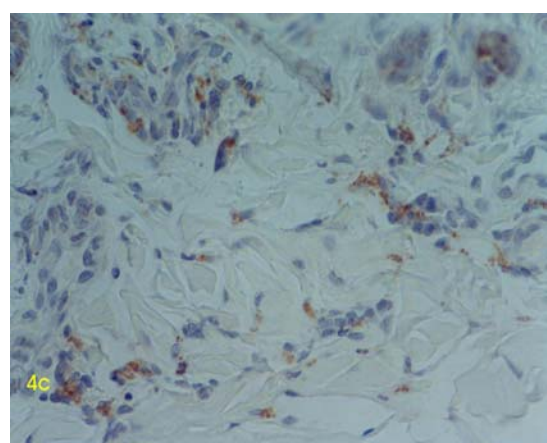
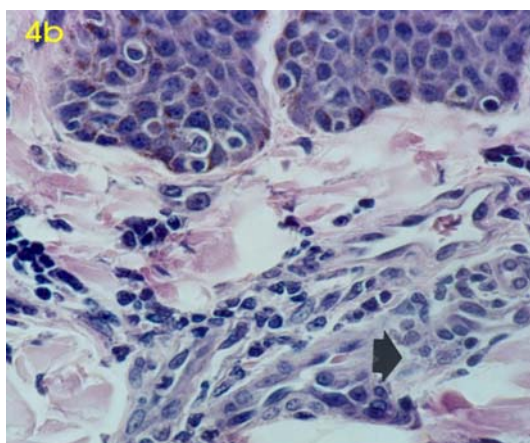
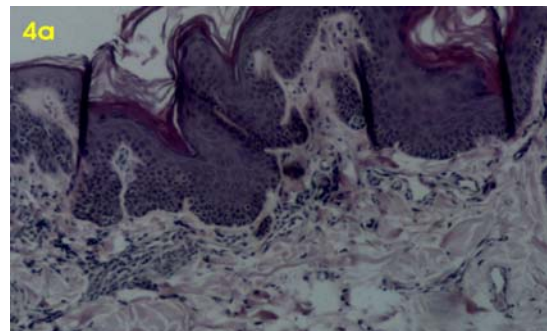
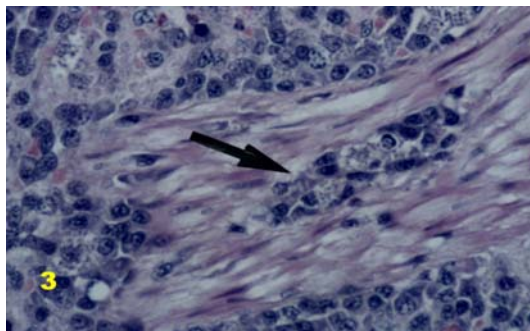
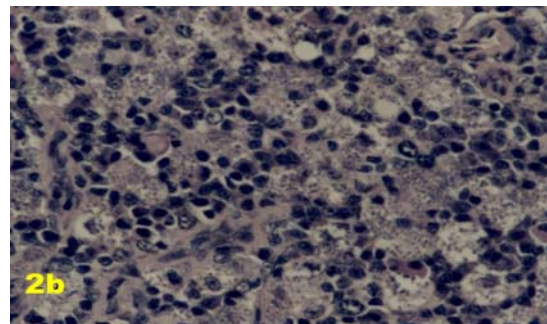
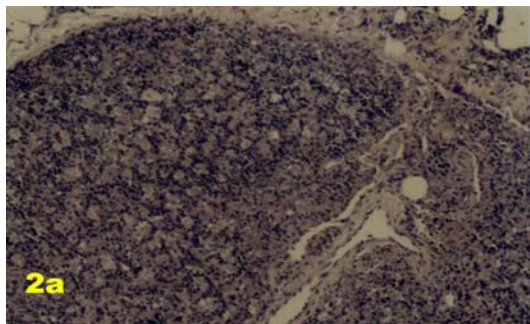
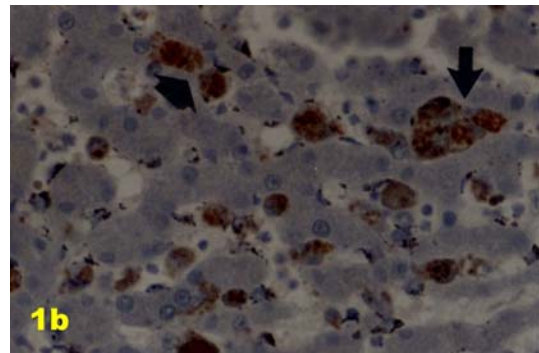
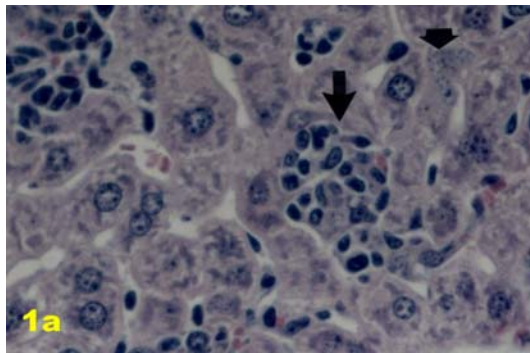
LEGENDS

Figure 1. Liver section of asymptomatic dog: a) observe an intralobular granuloma formation (arrow) and kupffer cells loaded with amastigotes of *Leishmania* (arrowhead). HE 440x; b) many immunolabelled amastigotes could be seen in granulomas macrophages (arrow) and inside of kupffer cells (arrowheads). Streptoavidin-peroxidase, 440x.

Figure 2. Popliteal lymph nodes section of asymptomatic dog: a) lymphoid nodules and the mantle zones in the cortex that surround the follicles were markedly attenuated. HE 40x. b) high magnification showing macrophages stuffed with amastigotes of *Leishmania*. HE 440x.

Figure 3. Spleen section of asymptomatic dog: red pulp showing an intense macrophages proliferation loaded with amastigotes of *Leshmania*. Note intracellular parasites in the spleen trabecular system (arrows). HE 440x

Figure 4. Muzzle section of asymptomatic dog: a) inflammatory cellular exudate could be noted in upper and deep dermis. HE.40x. b) Higher magnification showing inflammatory macrophages intensely parasitized with *Leishmania* (arrowheads). HE 440x. c) immunolabelled parasites are easily found inside macrophages in the dermis. Streptoavidin-peroxidase, 440x.



REFERENCES

- ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES G.M. Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. *Acta Med. Port.*, v.11, p.871-875, 1998.
- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N. et al. An experimental model for canine leishmaniasis. *Paras. Immunol.*, v.13, p.537-550, 1991.
- ANDERSON, D.C.; BUCKNER, R.G.; GLENN, B.L. et al. Endemic canine leishmaniasis. *Vet. Pathol.*, v.17, p.94-96, 1980.
- ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.59, p.53-57, 1998.
- CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S. et al. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.*, v.76, p.173-180, 1998.
- CIAMARELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.*, v.22, p.539-543, 1997.
- CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C. et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.89, p.155-158, 1995.
- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.4, p.149-212, 1962.
- DUARTE, M.I.S.; LAURENTI, M.D.; NUNES, V.L.B. et al. Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.28, p.431-436, 1986.
- FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. *Proceedings...* Barcelona, 1999. p.6-10.
- FERRER, L.; JUANOLA, B.; RAMOS, J.A. et al. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet. Pathol.*, v.28, p.342-343, 1991.
- FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. In conclusion, the results of the present study cast doubt on the relevance of infected but symptomless dogs in the epidemiology of canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.56, p.319-27, 1997.
- FONT, A.; CLOSA, J.M. Ultrasonographic localization of a caudal vena cava thrombus in a dog with leishmaniasis. *Vet. Radiol. Ultrasound.*, v.38, p.394-6, 1997.
- GENARO, O.; MAYRINK, W.; MICHLICK, M.S.M. et al. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.83, p.43, 1988.
- GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L.; MELO, M.N. et al. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* - histopathological and morphometrical study. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.45, p.1-12, 2003.
- GONZÁLEZ, J.L.; FERMIN, M.L.; GARCIA, P. et al. Erosive colitis in experimental canine leishmaniasis. *J. Vet. Med. B*, v.37, p.377-382, 1990.
- GRIMALDI, G.; TESH, R.B.; Mc MATHON-PRATT, D.A. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.41, p.687-725, 1989.
- GUEDES, G. E.; MAROJA, A; CHAVES, E. et al. Calazar no litoral do estado da Paraíba, Brasil. Encontro de 70 casos humanos e 16 caninos. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.16, p.265-600, 1978.
- MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B.F.; CARVALHO, R.W. Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol. Today*, v.10, p.37-40, 1994.
- MAURÍCIO I.L.; STOTHART J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today*, v.16, p.188-189, 2000.
- MICHALICK, M.S.M. Spreading of visceral leishmaniasis in urban area of Belo Horizonte, MG, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.88, supl. I, p.53, 1993.

- NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M.A. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.*, v.45, p.33-47, 1992.
- PELLEGRINO, J.; BRENER, Z. Reação de fixação de complemento com sangue dessecado no diagnóstico do calazar canino. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. Publ. Avulsas*, v.10, p.39-44, 1958.
- SILVA, F.L.; TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R. et al. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.54, p.340-344, 2002.
- SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. Filadélfia: W. B. Saunders, p.769-777. 1990.
- SOLANO-GALLEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of leishmania infantum-infected Dogs. *J. Comp. Pathol.*, v.130, p.7-12, 2004.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. of Clin. Microbiol.*, v.39, p.560-563, 2001.
- TAFURI, W.L.; MICHALICK, M.S.; DIAS, M. et al. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev.Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.3, p.139-145, 1989.
- TAFURI, Wg.L.; OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.96, p.203-212, 2001.
- TAFURI, Wg.L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, A.J.A. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Int. Med. Trop. São Paulo*, v.38, p.81-89, 1996.
- TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: Is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Hyg.* v.52, p.287-292, 1995.