



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

LETÍCIA MAXIMIANO BEZERRA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LESÕES
CUTÂNEAS DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum* (NICOLLE, 1908)**

Recife

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

LETÍCIA MAXIMIANO BEZERRA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LESÕES
CUTÂNEAS DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum* (NICOLLE, 1908)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Leucio Câmara Alves

Recife

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B574a Bezerra, Leticia
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LESÕES CUTÂNEAS DE CÃES
COM INFECÇÃO NATURAL POR Leishmania (Leishmania) infantum (NICOLLE, 1908) / Leticia Bezerra. -
2022.
62 f. : il.

Orientador: Leucio Camara Alves.
Inclui referências e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Recife, 2022.

1. Leishmaniose visceral canina . 2. Dermatopatias. 3. Histologia . 4. Imunohistoquímica. I. Alves,
Leucio Camara, orient. II. Título

CDD

LETÍCIA MAXIMIANO BEZERRA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS LESÕES
CUTÂNEAS DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum* (NICOLLE, 1908)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Biotecnologia Animal da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como pré-
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia Animal.

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Leucio Câmara Alves (Orientador)
Departamento de Medicina Veterinária- UFRPE

Dra. Edna Michelly de Sá Santos
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dr. Fabricio Bezerra de Sá
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Dr. Valdemiro Amaro da Silva
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

*À Marússia Bezerra e Mônica Bezerra, que nunca
mediram esforços em tornar esse sonho possível.*

A vocês, a minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por tudo que Ele me tem permitido viver, porque os planos dEle são sempre melhores que os meus!

Aos meus pais, irmãs e irmão e meus sobrinhos, por todo o apoio e suporte emocional;

A Marúsia e Mônica, que foram molas propulsoras em minha vida. Jamais vou conseguir mensurar o tamanho do meu amor e gratidão por tudo que vocês fizeram e fazem por mim;

A Robério Siqueira, meu noivo, que me impulsiona a ser uma melhor profissional e pessoa a cada dia. Essa é mais uma conquista juntos, das muitas outras que virão! Obrigada pelo cuidado, incentivo, amor e (muita) paciência comigo;

Ao meu orientador Prof. Leucio, pela oportunidade de crescimento e aprendizado profissional e pessoal, a quem tenho um carinho enorme. Muito obrigada por sempre me incentivar a crescer profissionalmente e torcer por mim.

Aos Professores Edna, Carina e Valdemiro e ao Dr. Vinicius por toda a disponibilidade com o andamento da pesquisa e também pelas contribuições na qualificação e defesa da dissertação, e estendo os agradecimentos a Alluanan, pela imensa ajuda no processamento e leitura das amostras, sem a ajuda de vocês não teria chegado até aqui;

Ao Prof. Fabrício, também membro da banca avaliadora, uma pessoa de coração ímpar e profissional sem igual. Muito obrigada por todos os ensinamentos não somente acadêmicos, mas de vida;

A todos da família LDP, pelo acolhimento e toda a ciência compartilhada, em especial à Janilene, Lara, Talita, Roseane, Wagner e Winny, vocês tornaram toda essa jornada bem mais leve e divertida, me sinto honrada em fazer parte desse time!

A todos os animais incluídos na pesquisa e seus tutores que consentiram as coletas. Sou muito grata por poder contribuir na evolução dos pacientes atendidos no laboratório de leishmanioses do HOVET-UFRPE;

A UFRPE, minha segunda (e eterna) casa há 10 anos, e a todos os funcionários que fazem parte do HOVET-UFRPE por contribuírem com o

andamento da pesquisa, e a CAPES pelo financiamento da bolsa acadêmica;

Aos demais amigxs que a veterinária me deu, que me entendem, ajudam e me confortam sempre que entro “em parafuso”;

A todos os amigxs “fora” da veterinária, mas que me apoiam e entendem meus momentos de ausência. Não ousou citar nomes pra não esquecer de ninguém;

E por último, mas não menos importante, a todos os animais que já tive a oportunidade de atender, o real motivo por eu estar aqui, por me tornarem uma profissional e pessoa melhor a cada dia!

*“(...) Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la
doce.*

Dificuldades para fazê-la forte.

Tristeza para fazê-la humana.

E esperança suficiente para fazê-la feliz.

(...)

As pessoas mais felizes

não têm as melhores coisas.

Elas sabem fazer o melhor

das oportunidades que aparecem

em seus caminhos.”

(Autor Desconhecido)

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença de caráter zoonótico e transmissão vetorial e de grande importância e impacto na saúde pública mundial. O presente estudo objetivou a avaliação histopatológica e imunohistoquímica das lesões cutâneas de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Para tanto, foram utilizados 30 cães atendidos no serviço ambulatorial de doenças parasitárias do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco e do município de Petrolina, com diagnóstico parasitológico positivo para *L. infantum*. As coletas de fragmento cutâneo foram realizadas com auxílio de um *punch* cirúrgico. Todos os animais possuíam alguma dermatopatia como sinal clínico cutâneo. A análise histopatológica de lesões ulceradas revelou que em 63,3% (19/30), das amostras analisadas apresentavam padrão inflamatório granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos em 68,43% (13/19), enquanto 31,57% dos animais apresentaram infiltrado piogranulomatoso composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Foram encontradas formas amastigotas de *L. infantum* na imunohistoquímica em 43,3% (13/30) das amostras analisadas. Diante do exposto, pode-se concluir que a histopatologia pode auxiliar como método diagnóstico, reforçando a importância da pele na leishmaniose canina e a imunohistoquímica como método diagnóstico complementar em cães positivos para *L. infantum* que apresentam dermatite ulcerativa ou descamativa.

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CANL) is a disease of zoonotic evaluation and vector-borne transmission with a huge importance and impact on public health worldwide. The present study aimed at the histopathological and immunohistochemical evaluation of the cutaneous lesions of dogs with natural infection by *Leishmania (Leishmania) infantum*. For that study were used 30 dogs treated at the outpatient parasitic disease service at the Veterinary Hospital of the Federal Rural University of Pernambuco and in the county of Petrolina, with a positive parasitological diagnosis for *L. infantum*. The skin fragment collections were performed with the aid of a surgical punch. All animals had some dermatopathy as a clinical cutaneous sign. The histopathological analysis of ulcerated lesions revealed that 63.3% (19/30) of the analyzed samples had a granulomatous inflammatory pattern composed of macrophages, lymphocytes and plasma cells in 68.43% (13/19), while 31.57% of the animals showed pyogranulomatous infiltrate composed of macrophages, lymphocytes, plasma cells and neutrophils. Amastigote forms of *L. infantum* were found on immunohistochemistry in 43.3% (13/30) of the samples analyzed. Given the above, it can be concluded that histopathology can help as a diagnostic method, reinforcing the importance of the skin in canine leishmaniasis and immunohistochemistry as a complementary diagnostic method in positive dogs for *L. infantum* that have ulcerative or desquamative dermatitis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

CANL – Canine Leishmaniasis

DC – Células dendríticas

MEC – Matriz extra celular

Th1 – Linfócitos *t-helper* 1

Th2 – Linfócitos *t-helper* 2

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

NO – Óxido nítrico

IC's – Imunocomplexos

MCH – Complexo de histocompatibilidade principal

HE – Hematoxilina-Eosina

IHQ – Imunohistoquímica

HP – Histopatológico

CEUA – Comissão de Ética do Uso de Animais

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

mm – Milímetro

μm – Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina	16
2.2 Aspectos clínicos da Leishmaniose visceral canina	17
2.3 Imunopatogenia da Leishmaniose Visceral Canina na pele.....	18
2.3.1. Pele	18
2.4 Diagnóstico	21
2.4.1 Diagnóstico parasitológico.....	21
2.4.2 Diagnóstico sorológico.....	22
2.4.3 Diagnóstico molecular	22
2.5 Avaliação histológica da pele de cães com infecção por <i>L. infantum</i> ..	23
3. REFERÊNCIAS	24
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2 Objetivos específicos	34
CAPÍTULO I.....	35
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DA CARGA PARASITÁRIA DE LESÕES CUTÂNEAS ÍNTEGRAS E ULCERADAS DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> (NICOLLE, 1908) ..	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1 Aspectos éticos e animais estudados	38
2.2 Coleta dos materiais e processamento histológico.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4. CONCLUSÃO.....	41
5. REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO II.....	46
EVALUATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF <i>Leishmania infantum</i> IN DIFFERENT PATTERNS OF DOG SKIN MANIFESTATIONS	46
1.INTRODUCTION.....	48
2. MATHERIAL AND METHODS.....	49
2.1 <i>Animals and ethical aspects</i>	49

2.2 Clinical examination of and classification of cutaneous lesions	49
2.3 Collection of skin biopsy and immunohistochemical processing	49
2.4 Immunohistochemical method for labeling amastigote forms of <i>L. infantum</i> (TAFURI et al, 2004)	50
3.RESULTS AND DISCUSSION.....	50
4.CONCLUSIONS.....	52
5. REFERENCES.....	52
5.CONCLUSÕES GERAIS	56
ANEXO 1.....	57
ANEXO 2.....	58
ANEXO 3.....	59
ANEXO 4.....	60
ANEXO 5.....	61

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças transmitidas por vetores, com diferentes manifestações clínicas, causadas por protozoários parasitas unicelulares pertencentes à família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*, que constituem um grande problema de saúde pública mundial, apresentando um aumento crescente de casos a nível global na última década (ALVAR, 2012; AKHOUNDI, 2016; WHO, 2018). Estes protozoários podem ser transmitidos a mamíferos, incluindo seres humanos, através do repasto sanguíneo de uma das mais de 90 espécies de flebotomíneos, principalmente dos gêneros *Phlebotomus* no velho-mundo ou *Lutzomyia* no novo-mundo, que estão relacionadas à transmissão das Leishmanioses (PALATNIK-DE-SOUSA, 2012; LOPES *et al.*, 2017).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma com a maior taxa de letalidade da doença, causada pela infecção por *L. (Leishmania) infantum* no novo-mundo ou *L. (Leishmania) donovani* no velho-mundo (GUERIN *et al.*, 2002; WERNECK, 2010; WHO, 2015). No Brasil, a forma visceral da doença, causada pela *Leishmania infantum*, pode causar infecção em várias espécies de animais domésticos e silvestres e o homem, sendo considerada uma antropozoonose de ampla distribuição e importância no país, que detém cerca de 90% dos casos humanos (BRASIL, 2014; COSTA, 2014).

A LV pode infectar vários mamíferos, como cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), gambás (*Didelphis spp*), gato doméstico (*Felis catus*), rato-preto (*Rattus rattus*), mas sua importância nos ciclos silvestre e urbano ainda precisa ser mais bem elucidada (MAIA; DANTAS-TORRES; CAMPINO, 2018). Os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) são considerados os principais reservatórios urbanos naturais do parasita no ciclo doméstico no Brasil (BRASIL, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018), devido à sua relação com os humanos e pelo elevado parasitismo cutâneo, possuindo alta prevalência e precedendo casos humanos, podendo apresentar doença com sinais clínicos ou somente infecção nos animais assintomáticos. (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; MAGALHÃES JUNIOR, 2015; KAMHAWI, 2017; MIRÓ e VÉLEZ, 2018; LAMATTINA *et al.*,

2019).

Os sinais clínicos da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) apresentados são variáveis e comuns à outras doenças, estando mais frequentemente relacionados emagrecimento progressivo, onicogrifose, linfadenomegalia e dermatopatias, apresentações clínicas que podem ser importantes para a triagem de animais infectados em áreas endêmicas por apresentarem alta frequência (HEPBURN, 2003; SARIDOMICHELAKIS, 2010; CARDOSO, 2018).

As lesões cutâneas podem apresentar diferentes aspectos por conta das complexas interações parasito-hospedeiras envolvidas e aspectos variáveis da resposta imune do animal, não ocorrendo na mesma intensidade da doença (SACCHI et al., 2006; BARBIERI, 2006; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Desta forma, a pele representa o primeiro elo de interação entre o parasito e o hospedeiro, atuando como fonte das formas infectantes do parasito, para que ocorra a transmissão ao vetor flebotomíneo, e pode ser utilizada como forma de monitoramento da doença, por se tratar de um órgão onde pode ser encontrado uma grande quantidade de formas amastigotas da *L. infantum* tanto em animais doentes, como em animais aparentemente sadios (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; SARIDOMICHELAKI et al., 2007; RAMOS et al., 2013).

Assim sendo, o presente trabalho objetivou avaliar a carga parasitária das lesões inflamatórias cutâneas de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose visceral canina (LVC) é transmitida comumente no Brasil pelos vetores flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) (RANGEL et al., 2018), e em algumas localidades específicas, pela *Lu. cruzi* (OLIVEIRA DOS SANTOS et al., 2003) e *Lu. migonei* (SILVA et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2016). As fêmeas flebotomíneas realizam o repasto sanguíneo em diversas espécies, incluindo humanos, caninos, equinos, bovinos, aves, roedores, marsupiais, entre outros, com grau de preferência variável entre os estudos apresentados (MISSAWA et al., 2008; SANT'ANNA et al., 2008).

O ciclo da doença se inicia com o repasto sanguíneo da fêmea ao sugar o sangue de mamíferos infectados, onde há a ingestão da forma amastigota da *Leishmania* em macrófagos parasitados. No trato digestivo do flebotomíneo, o parasito realiza a diferenciação na sua forma flagelada, a promastigota, onde posteriormente há uma nova diferenciação para paramastigotas, que migram para o esôfago do vetor onde há a transformação na sua forma infectante, as promastigotas metacíclicas (BRASIL, 2014; GHARBI *et al.*, 2015).

Quando há um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, o vetor regurgita saliva e libera por meio dela as promastigotas metacíclicas. Na epiderme do hospedeiro, as células mononucleares fagocitárias do sistema imune inato fagocitam esses parasitos. No interior dos macrófagos ou das células dendríticas (DC), há uma nova diferenciação para amastigotas e é iniciada a reprodução dos parasitos até o rompimento das células e infecção de novas DCs e macrófagos. Após este processo, há a disseminação pela circulação sanguínea, principalmente para tecidos e órgãos ricos em macrófagos e DCs, como medula óssea, fígado, linfonodos, baço e na derme, dando continuidade ao ciclo (BRASIL, 2014; GHARBI *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Apesar do habitat do flebotomíneo ser preferencialmente silvestre, o crescimento urbano e ocupação humana em áreas próximas às regiões de vegetação nativa modificaram e adaptaram estes vetores ao ambiente peridomiciliar (LAINSON; RANGEL, 2005; SANTINI *et al.*, 2015), tornando os cães os principais reservatórios urbanos naturais do parasita no ciclo doméstico no Brasil, antecedendo os casos humanos e estando diretamente ligados à rápida distribuição da doença entre outros mamíferos, incluindo o homem, dificultando a eliminação da doença (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; BRASIL, 2014; KAMHAWI, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2018).

2.2 Aspectos clínicos da Leishmaniose visceral canina

A LVC é uma doença sistêmica que pode acometer vários órgãos, e o número e a intensidade dos sinais clínicos apresentados são determinados por fatores que envolvem o parasita e o estado imunológico do hospedeiro (SOLLANO-GALLEGO, 2011). Os cães infectados podem ser assintomáticos,

que podem variar de 20% a 40% dos animais sorologicamente positivos, onde esses animais também podem transmitir a doença, da mesma forma dos que apresentam sinais clínicos (GRAMICCIA, 2011).

Os sinais clínicos são variados e incluem, com maior frequência, linfadenopatia, dermatopatias, emagrecimento progressivo, oftalmopatias, hepatoesplenomegalia, diarreia, onicogrifose, e em estágios mais avançados, pode ser observada paresia dos membros posteriores, caquexia e anorexia, lesões renais, como glomerulonefrites, que podem evoluir a uma síndrome nefrótica e insuficiência renal crônica. Há ainda sinais clínicos mais incomuns, como poliartrites e sinais neurológicos (FEITOSA et al., 2000; LEITE *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2011; LAURENTI *et al.*, 2013; BRASIL, 2014;).

As dermatopatias estão entre os sinais clínicos mais comumente observados, podendo representar 80% a 90% dos casos. (SARIDOMICHELAKIS, 2010; FIGUEIREDO; CARDOSO, 2018). Além disso, a pele com presença de formas amastigotas de *Leishmania* é responsável pela transmissão do parasita aos vetores e pode ser empregada para monitoramento dos animais submetidos ao tratamento da LVC (SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009; KOUTINAS; SARIDOMICHELAKIS, 2010; RAMOS et al., 2013)

.

2.3 Imunopatogenia da Leishmaniose Visceral Canina na pele

2.3.1. Pele

A pele é o maior órgão e possui múltiplas funções essenciais à vida, entre elas, barreira contra agentes externos, funções sensoriais, de termorregulação, e imunológicas (SCOTT et. al, 2001; LOPES *et al.*, 2009; MARCONDES et al., 2020). Além de ser o primeiro órgão de defesa do corpo contra as adversidades do meio externo, possui papéis importantes, cujas complexidades e hígidez contribuem para a manutenção da homeostase no organismo (SCOTT et. al, 2001; LOPES *et al.*, 2009).

A pele é dividida em duas camadas de acordo com sua estrutura: epiderme, derme e hipoderme. Estas são interligadas e dispostas de maneira a manter adequadamente o desempenho de suas funções (SCOTT *et al.*, 2001).

A epiderme é composta por uma camada de tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado estando acima da derme, que é constituída por uma camada formada por tecido conjuntivo denso não modelado, possuindo uma variedade de células e uma matriz extracelular (MEC), complexo de macromoléculas produzidas por fibroblastos e exportados por eles para o espaço intercelular. A derme confere, além de organização estrutural, elasticidade, força tensora e resistência mecânica à pele (SCOTT *et al.*, 2001). A hipoderme é ligada à derme e composta por tecido adiposo ligado por fibras colágenas que atuam como uma barreira térmica, além de armazenar energia e proteger contra choque mecânico (SCOTT *et al.*, 2001).

2.3.2. Infecção por *L. infantum* na pele

A LVC é classificada clinicamente como uma doença imunomediada, dessa forma, na infecção por *L. infantum* nos cães, a pele é um órgão determinante na progressão da doença, devido às complexas interações que ocorrem no sistema imune do hospedeiro ao entrar em contato com o parasita, uma vez que a inoculação de parasitos pelos flebotomíneos irá atingir a derme, e pelo fato das amastigotas presentes na pele do hospedeiro atuarem como fonte de infecção aos flebotomíneos (ORDEIX *et al.*, 2005; SILVA, 2007; KOUTINAS *et al.*, 2010; MAIA E CAMPINO, 2012; DE VASCONCELOS *et al.*, 2017).

Segundo Saridomichelaki (2017), a pele é considerada a primeira linha de defesa contra a *L. infantum* e atua como fonte das formas infectantes do parasito para que ocorra a transmissão ao vetor flebotomíneo, sendo considerada o início da interação parasito-hospedeiro. Desta forma, o parasitismo e a severidade das lesões cutâneas estão diretamente associados a resposta imune do animal, não ocorrendo na mesma intensidade durante a evolução da doença (SACCHI *et al.*, 2006; BARBIERI, 2006; SARIDOMICHELAKI *et al.*, 2007).

L. infantum pode infectar muitos tipos celulares, incluindo células do sistema fagocítico mononuclear, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, neutrófilos, eosinófilos, conseguindo, desta forma, invadir quase todos os tecidos e órgãos do corpo (SCOTT *et al.*, 2001). Na resposta imune da LVC na pele, as células do sistema mononuclear fagocitário atuam como células apresentadores de antígeno e estimulam os linfócitos T (“T *helper*”) do tipo CD4+,

estimulando a produção de interleucinas que desenvolvem linfócitos do tipo Th1 ou Th2 a depender do tipo de perfil produzido (REIS *et al.*, 2009; MARCONDES *et al.*, 2020).

Os linfócitos Th1 são relacionados ao mecanismo de resistência do hospedeiro frente à infecção, onde estes liberam citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN γ), interleucina (IL) IL-2 e IL -12, que atuam na ativação de macrófagos responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO), que são responsáveis por promover a apoptose de células parasitadas, representando um papel importante na resposta imune celular (CORTESE, 2013; DUARTE *et al.*, 2016; SILVA, 2017). A resposta humoral é caracterizada pelos linfócitos Th2, que secreta citocinas IL-4, TGF- β e prostaglandina PGE₂, que estimula a produção de anticorpos e induz o aparecimento de sinais clínicos (REIS, 2006; MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010; COSTA-PEREIRA *et al.* 2015; SILVA, 2017).

A produção contínua de anticorpos leva à hipergamoglobulonemia crônica que resulta na formação e deposição de imunocomplexos (ICs) que gera lesões inflamatórias em diversos tecidos (SILVA, 2007; PALTRINIERI *et al.*, 2010; PAPADOGIANNAKIS; KOUTINAS, 2014).

Solano-Gallego e seus colaboradores (2009) relatam que podem ocorrer outros sinais clínicos e/ou anormalidades patológicas associadas às lesões dermatológicas, mas as dermatopatias na LVC são o sinal clínico mais comumente encontrado, apesar da natureza viscerotrópica do protozoário (FERRER *et al.*, 1988; SLAPPENDEL e FERRER, 1998; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2004). Embora possa apresentar variações quanto à sua extensão e caracterização, é relatada uma frequência entre 81% e 89% de algum tipo de lesão dermatológica dos cães infectados (ALVAR *et al.*, 2004; BANETH *et al.*, 2008).

Os padrões dermatológicos na LVC incluem o padrão alopecico-descamativo e ulcerativo, mais frequentemente encontrados, o nodular e pustular-estéril os menos descritos, e as hiperqueratoses (FERRER *et al.*, 1988; KOUTINAS, 2014; SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018).

O perfil de resposta imune que o cão demonstra pode explicar a variedade

de lesões dermatológicas, visto que animais naturalmente infectados apresentaram diferentes perfis de citocinas, conferindo suscetibilidade ou não à doença (PINELLI *et al.*, 1994; REIS *et al.*, 2009).

Silva (2007) relata dois padrões de resposta inflamatória distintos nos cães naturalmente infectados por *L. infantum*, um sendo encontradas células de Langerhans, queratinócitos, MCH II+, infiltrado de células T e formas amastigotas de *L. infantum* em cães com dermatite alopecica, e um segundo, com ausência de células apresentadoras de antígenos com pouca quantidade de amastigotas e de macrófagos em cães com lesões nodulares.

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da LVC é complexo devido à variedade de sinais clínicos inespecíficos (GHARBI *et al.*, 2015). Desta forma, deve-se seguir os critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais e muitas vezes é necessária a combinação de provas diagnósticas parasitológicas, sorológicas e/ou moleculares, uma vez que não existe um único teste diagnóstico que possua alta especificidade e sensibilidade (GRANDONI, 2002; ABRANTES *et al.*, 2016).

2.4.1 Diagnóstico parasitológico

O exame parasitológico direto é considerado o método “padrão-ouro”, pois permite identificar microscopicamente as formas amastigotas do parasito na amostra analisada (NOGUEIRA e RIBEIRO, 2015). Apesar de conferir alta especificidade, a sensibilidade é variável a depender da carga parasitária, tipo de amostra biológica e experiência do leitor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A identificação das formas amastigotas pode ser realizada através de citologia aspirativa de medula óssea, linfonodo e nódulos cutâneos, esfregaço sanguíneo, citologia esfoliativa de pele íntegra e/ou ulcerada, swab conjuntival (NOGUEIRA, 2006).

A avaliação histopatológica avalia alterações estruturais, auxiliando no diagnóstico (CONCEIÇÃO & LOURDES, 2020). Entretanto, este tipo de diagnóstico possui limitações, como dificuldade de reconhecimento do parasita

e pouca sensibilidade quando utilizado de forma singular, comparado a outros métodos diagnósticos (FERRER *et al.*, 1988; GIUNCHETTI *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2011; CONCEIÇÃO e LOURDES, 2020). Vale salientar que, em infiltrados inflamatórios localizados não são identificadas formas amastigotas usualmente, contudo, em infiltrados inflamatórios difusos parece haver uma correlação entre a intensidade da inflamação e a carga parasitária (GIUNCHETTI *et al.*, 2006).

A imuno-histoquímica (IHQ) é considerada uma prova parasitológica e é utilizada de forma complementar ao exame histopatológico. Além disso, pode ser utilizado em pele lesionada e íntegra (ORDEIX *et al.*, 2005; PAPADOGIANNAKIS *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2010). A técnica consiste na detecção de antígenos *in situ* através da utilização de um anticorpo (policlonal ou monoclonal) primário, relativamente específico, e um sistema de enzima e substrato cromógeno que se deposita no local da reação antígeno-anticorpo (TASCA *et al.*, 2009). O diagnóstico depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e de tamanho compatíveis com amastigotas (FERRER *et al.*, 1988; BOURDOISEAU *et al.*, 1997; SOLANO-GALLENO *et al.*, 2004; XAVIER *et al.*, 2006; RAMOS-VARA *et al.*, 2008).

2.4.2 Diagnóstico sorológico

Os testes mais utilizados na rotina clínica e recomendados como teste de triagem e confirmação da infecção por *L. infantum* são, respectivamente, o teste imunocromatográfico (Dual Path Plataforma – DPP – BioManguinhos) e o Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; BRASIL, 2014). No entanto, estes testes não possuem sensibilidade nem especificidade de 100%, podendo ocorrer reações cruzadas com *Trypanosoma caninum*, *Babesia spp*, *Ehrlichia spp* e *Anaplasma spp*. (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2012; RIBEIRO, 2018).

2.4.3 Diagnóstico molecular

A reação em cadeia de polimerase (PCR) permite a amplificação de

fragmentos de DNA de *Leishmania* e tem sido utilizada como forma de diagnóstico molecular. Nesta técnica, diferentes tecidos podem ser utilizados, como de aspirado de medula óssea, linfonodos e leucócitos de sangue periférico (IKONOMOPOULOS et al., 2003; FERREIRA, 2013). Como a PCR possibilita quantificar o número de cópias de DNA na amostra biológica analisada, se torna uma técnica utilizada para monitoramento do paciente, pois permite informações quanto à carga parasitária (FERREIRA, 2013).

2.5 Avaliação histológica da pele de cães com infecção por *L. infantum*

O exame histopatológico com coloração em hematoxilina-eosina (HE) permite avaliar alterações estruturais, auxiliando o diagnóstico parasitológico (CONCEIÇÃO e LOURDES, 2020). Os achados histopatológicos descritos na pele de cães com LVC são compatíveis com dermatite mononuclear difusa, dermatite granulomatosa, dermatite ulcerativa ou dermatite pustular estéril sem acantólise, além de dermatite mononuclear perifolicular e perivascular (MINTY et al., 1997; BRACHELENTE et al., 2005). Pode ser encontrado predominantemente infiltrado inflamatório piogranulomatoso na pele com macrófagos com presença de formas amastigotas, apresentando pequeno número de linfócitos e plasmócitos (BANETH et al., 2008; COSTA et al., 2008; CALABRESE et al., 2010).

Os padrões histopatológicos mais comuns são a dermatite perivascular mononuclear superficial ou profunda, hiperqueratose paraqueratótica ou ortoqueratótica folicular e epidérmica, dermatite intersticial, adenite sebácea, inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa e perifoliculite granulomatosa. O infiltrado inflamatório na pele consiste em macrófagos com pequeno número de linfócitos e plasmócitos. As glândulas sebáceas podem estar repletas e obliteradas pela inflamação. Pode haver foliculite pustular e de pústulas intradérmicas, assim como vasculite necrosante, a depender do estágio clínico da doença (MINTY et al., 1997; BRACHELENTE et al., 2005; GIUNCHETTI et al., 2006). Contudo, as formas amastigotas podem ser observadas em menor quantidade quando há infiltrados inflamatórios localizados em relação a infiltrados inflamatórios difusos, que possuem carga parasitária mais alta quando há maior inflamação (GIUNCHETTI et al., 2006).

3. REFERÊNCIAS

- ABRANTES, T. R.; MADEIRA, M. DE F.; DA SILVA, D. A. Identification of canine visceral leishmaniasis in a previously unaffected area by conventional diagnostic techniques and cell-block fixation. *Rev. do Instit. de Med. Trop. de São Paulo*, v. 58, n. 3, 2016.
- AKHOUNDI, M., KUHLS, K., CANNET, A., VOTÝPKA, J., MARTY, P., DELAUNAY, P., et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(3): e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>, 2016.
- ALVAR, J., VÉLEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*); 7(5): e35671, 2012.
- BANETH, G. KOUTINAS, A. F., SOLANO-GALLEGU, L., BOURDEAU, P., & FERRER, L. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitol.*, v. 24, p. 324-330, 2008.
- BARBIÉRI CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.*28(7):329–3, 2006.
- 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. Diagnostic. Investig.* 9(4):439–40, 1997.
- BRACHELENTE, C., MÜLLER, N., DOHERR, M. G., SATTLER, U., & WELLE, M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet. Path.*, v. 42, p. 166-175, 2005.
- BRASIL. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde, Dep. de Vig. Epidem. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL M DA S. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral [Internet]. Sec. de Vig. em Saúde. 120 p. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf, 2014.

CALABRESE, K. S., CORTADA, V. M. C. L., DORVAL, M. E. C., LIMA, M. S., OSHIRO, E. T., SOUZA, C. S. F., & ABREU-SILVA, A. L. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. *Exp. Parasitol.*, v. 124, p. 253-257, 2010.

CARDOSO, J. M. D. O. Tratamento da leishmaniose visceral canina empregando duas abordagens terapêuticas distintas: quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal e imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2018.

CONCEIÇÃO, G, L; LOURDES, F.H. Biópsia e histopatologia da pele. In: LARSSON, C.E & LUCAS, R. *Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária* – 2 ed. S. Caetano do Sul, São Paulo. Interbook, 2020.

COSTA, M. M. S., LIMA, W. G., FIGUEIREDO, M. M., MICHALICK, M. S. M., TAFURI, W. L. Cervical, mandibular, and parotid lymphonodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Vet. Path.*, v. 45, p. 613-616, 2008.

COSTA, J. M. L., COSTA, A. A. U. M. L. D., ELKHOURY, A. N. S. M., BEZERRIL, A. C. R., BARRAL, A. M. P., & SALDANHA, A. C. R. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. *Gaz. Méd. da Bahia*, v.79(Supl.3), p.16–24, 2009.

COSTA-PEREIRA, C., MOREIRA, M. L., SOARES, R. P., MARTELETO, B. H., RIBEIRO, V. M., FRANÇA-DIAS, M. H. & ARAÚJO, M. S. One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. *BioMed Cent. Vet. Res.*, London, v. 11, p.92, 2015.

DANTAS-TORRES F. Canine leishmaniosis in South America. *Paras. Vectors*;2(SUPPL.1):1–8, 2009.

DANTAS-TORRES F, SOLANO-GALLEGO L, BANETH G, RIBEIRO VM, DE PAIVA CAVALCANTI M, OTRANTO D. Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitol* [Internet].;28(12):531–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007>, 2012.

DE VASCONCELOS, T. C. B., FURTADO, M. C., BELO, V. S., MORGADO, F. N., & FIGUEIREDO, F. B. Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: A systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infect. Genet. Evolut.* v.74, 2017.

DUARTE, M.C., LAGE, D. P., MARTINS, V. T., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A., ROATT, B. M., MENEZES-SOUZA, D. & COELHO, E. A. F. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.*, Brasília, v. 49, n. 4, p. 398-407, 2016.

ELMAHALLAWY EK, SAMPEDRO MARTÍNEZ A, RODRIGUEZ-GRANGER J, HOYOSMALLECOT Y, Agil A, NAVARRO MARI JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J. Infect Dev Ctries.* 8(8):961–72, 2014.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Arçatuba – São Paulo (Brasil). *Clín. Veterinária*, ano 5, n. 28, p 36-44, 2000.

FERREIRA, S. A., LEITE, R. S., ITUASSU, L. T., ALMEIDA, G. G., SOUZA, D. M., FUJIWARA, R. T., & MELO, M. N. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 6, p. 1-9, 2013.

FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. of Small Anim. Pract.*, v. 29, p. 381-388, 1988.

FERRER L, RABANAL RM, DOMINGO M. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci.* v.44, p.194-196, 1988.

FIGUEIREDO, M. M. et al. Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Histol. Histopatho.*, v. 25, p. 877-887, 2010.

FIGUEIREDO, FB & MADEIRA, MF. Os parasitas e a questão da infecção em animais domésticos e domiciliados. In Fátima Conceição, Carlos Roberto Alves. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro. Ed. Fiocruz. p. 259-273, 2014.

FREITAS, M. V. D. M., BRUN, C. F. D. L., RODRIGUES, M. C., ALVES, G. B. B., LEAL, A. F., GROLLI, L., & QUESSADA, A. M. Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil. *Ciência Rural*, v.47, 2017.

GALVIS-OVALLOS, F., CASANOVA, C., BERGAMASCHI, D.P., GALATI, A.B. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v. 12, p. 1-14, 2018.

GIUNCHETTI, RC.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, CM.; CORREAOLIVEIRA, R. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Pathol.* v. 135, p.100–107, 2006.

GHARBI M, MHADHBI M, REJEB A, JAOUADI K, ROUATBI M, DARGHOUTH MA. Leishmaniasis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Rev Sci Tech l'OIE* [Internet];34(2):613–26. Available from: <http://doc.oie.int:8080/dyn/portal/index.seam?page=alo&alold=33005119>, 2015.

GRANDONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Proceedings of second international canine leishmaniasis forum. Sevilla, Spain. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Salamanca: *Intervet Intern.*, p.7-14, 2002.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet infect. dis.* 2:494-501, 2002.

GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasit. & Vect.*, v. 9, p. 159, 2016.

HEPBURN N C. Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J. Postgrad. Med*; v. 49, p. 50-54, 2003.

IKONOMOPOULOS, J., KOKOTAS, S., GAZOULI, M., ZAVRAS, A., STOITSIOU, M., & GORGOLIS, V. G. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.*, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.

KAMHAWI S. The yin and yang of leishmaniasis control. *PLoS Negl. Trop. Dis.*; v. 11(4):p. 1–6, 2017.

KOUTINAS, A.F., SARIDOMICHELAKIS, M.N. Il coinvolgimento cutâneo nella Leishmaniosi canina. In: *Leishmaniosi Canina: Recenti Acquisizioni su Epidemiologia, Implicazioni Cliniche, Diagnosi, Terapia e Prevenzione*. Italy: Ed. Vet., p.29–39, 2010.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet. Pat.*, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

LAGO, J. *et al.* Clinical and histopathologic features of canine tegumentary leishmaniasis and the molecular characterization of *Leishmania braziliensis* in dogs. *Plos Negl. Trop. Dis.*, v. 13, n. 7, p. 1-14, 2019.

LAINSON R, RANGEL BF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*,v.100(8), p. 811–827, 2005.

LAMATTINA D, BERROZPE PE, CASAS N, MOYA SL, GIULIANI MG, COSTA SA, *et al.*) Twice upon a time: The progression of canine visceral leishmaniasis in an Argentinean city. *PLoS ONE*, v.14(7): e0219395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219395>, 2019.

LARA-SILVA F de O, MICHALSKY ÉM, FORTES-DIAS CL, FIUZA V de OP, PESSANHA JEM, REGINA-SILVA S, *et al.* Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* v. 148, p. 128–136, 2015.

LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; MATTA, V.L. da; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.; SACUNDINO, N.F.; PIMENTA, P.F.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet. Parasitol.*, v.196, n 3-4, p 296-300, 2013.

LEAL, G. G. de A. *et al.* Immunological profile of resistance and susceptibility innaturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, v. 205, p. 472-482.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714004762>>, 2014.

LEITE, R.S.; FERREIRA, S.A.; ITUASSU, L.T.; MELO, M.N.; ANDRADE, A.S.R. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swabs samples. *Vet. Parasitol.*, v.170, p.201-206, 2010.

LOPES, E.G., SEVÁ, A. D. P., FERREIRA, F., NUNES, C. M., KEID, L. B., HIRAMOTO, R. M. & GALATI, E. A. B. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiol. Infect.* v. 145 n. 12, p.2436-2444, 2017.

LOPES, A.C. (editor). Tratado de Clínica Médica. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2009.
MAGALHÃES JUNIOR, J. T. Aspectos vetoriais da *Lutzomyia longipalpis*: resposta comportamental a compostos orgânicos voláteis e uso na avaliação de infectividade de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Tese (Doutorado em Ciência Animal dos Trópicos) – Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015.

MAIA C, CAMPINO L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.*158(4):274–87, 2008.

MAIA C, DANTAS-TORRES F, CAMPINO L. Parasite Biology: The Reservoir Hosts. In: The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases [Internet]. Cham: Springer Internat. Publishing. p. 79–106. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_4, 2018.

MANCIANTI F., GRAMICCIA M., GRADONI L., PIERI S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transact. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.*; v. 82(4), p. 566–567, 1988.

MARCONDES, M. Leishmaniose. In: LARSSON, C.E & LUCAS, R. Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária – 2 ed. São Caetano do Sul, São Paulo. Interbook, 2020.

MINTY, A, ASSELIN, S, BENSUSSAN, A, SHIRE, D, VITA, N, VYAKARNAM, A, WIJDENES, J, FERRARA, P, CAPUT, D. The related cytokines interleukin-13 and interleukin-4 are distinguished by differential production and differential effects on

T lymphocytes. *Eur Cytokine Netw.* v.8, p.203–213, 1997.

MISSAWA, N. A., LOROSA, E. S., & DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. *Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.*, v. 41, n. 4, p. 365-368, 2008.

MIRÓ, G., GÁLVEZ, R., MATEO, M., MONTOYA, A., DESCALZO, M. A., & MOLINA, R. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet. Parasitol.* v. 143, p. 375–379, 2007.

MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., OLIVA, G., & BANETH, G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitol.* v.24, p.371–377, 2008.

MIRÓ, G.; VÉLEZ, R. L. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Vet. Parasitol.*, v.254, p.151-159, 2018.

MOLYNEUX DH, SAVIOLI L, ENGELS D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. *Lancet* [Internet]. v.389(10066), p. 312–325. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30171-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30171-4), 2017.

NOGUEIRA, F.S & RIBEIRO, V.M. Leishmaniose Visceral. In: Jericó MM., Kogica MM. & Neto JPA. *Trat. de Med. Intern. de Cães e Gatos*. 1. Ed. Rio de Janeiro: Roca. p. 718-33, 2015.

OMS. WHO: Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Heal Organ Geneva*. 2017; v. 92(38), p.557–572.

OPS/OMS OP de la S. Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas. *Inf Leishmaniasis*. v. 4, p. 3–7, 2016.

ORDEIX L, SOLANO-GALLEGO L, FONDEVILA D ET AL. Papular dermatites due to *Leishmania spp.* infection in dogs with parasite specific cellular immune responses. *Vet. Dermatol.* v.16, p.187–191, 2005.

ORDEIX L, FONDATI A. Manifestaciones clínicas cutáneas. In: Solano-Gallego

L, editor. Leishmaniasis canina. Una revisión actualizada ed. Zaragoza: Servet, p. 69–95, 2013.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Vaccines for canine leishmaniasis. *Front Immunol.*; v. 3, p. 1-15, 2012.

PALTRINIERI, S., SOLANO-GALLEGO, L., FONDATI, A., LUBAS, G., GRADONI, L., CASTAGNARO, M., CROTTI, A., MAROLI, M., OLIVA, G., ROURA, X. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* v.236, p.1184–1191, 2010.

PAPADOGIANNAKIS, E. I., KOUTINAS, A. F., SARIDOMICHELAKIS, M. N., VLEMMAS, J., LEKKAS, S., KARAMERIS, A., & FYTIANOU, A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol. and Immunop.*, v. 104, p. 227-237, 2005.

PINELLI, E., KILLINK-KENDRICK. R., WAGENAAR, J. BRRNADINA, W., DEL REAL, G. AND RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* v.62, p.229-235, 1994.

QUEIROZ, N. M. G. P. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA - teste. *Rev. Bras. de Parasitol. Vet.*, v. 19, p. 32-38, 2010.

QUEIROZ, N.M.G.P., SILVEIRA, R.C.V., NORONHA, A.C.F. Jr., OLIVEIRA, T.M.F.S., MACHADO, R.Z., STARKE-BUZETTI, W.A. Detection of *Leishmania (L.) infantum* in canine skin. *Chagasi Vet. Parasitol.* v.178, p.1-8, 2011.

RAMOS RAN, RAMOS CAN, SANTOS EMS, ARAÚJO FR, CARVALHO GA, FAUSTINO MAG. Quantification of DNA in the bone marrow, lymph node and spleen of dogs. *Leishmania infantum*. *Rev. Bras Parasitol Vet.* v.22, n.3, p.346-350, 2013.

RANGEL E.F., LAINSON R., CARVALHO B.M., COSTA S.M., SHAW J.J. Sand Fly Vectors of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In: Rangel E., Shaw J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham. v. 01, p. 341-381 , 2018.

REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R. C., GUERRA, L. L., CARVALHO, M. D. G., MAYRINK, W., & MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic

features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clinic. & Experim. Immunol.*, v. 146, p. 303-311, 2006.

RIBEIRO RR, MICHALICK MSM, DA SILVA ME, DOS SANTOS CCP, Frézard FJG, DA SILVA SM. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int* [Internet]. (CI):1–12. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3296893/>, 2018.

RIBEIRO R. R., SILVA S. M., FULGÊNCIO G. d., MICHALICK M. S., FRÉZARD F. J. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Rev. Bras. de Parasitol. Vet.* v. 22(3):373–378,2013.

RIDLEY, D.S; RIDLEY, M. The Evolution of lesions in cutaneous leishmaniasis. *J. Pathol.*, v.141, p. 83-96, 1983.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. *Vet. Dermatol.*, v. 18, p. 227-233, 2007.

SARIDOMICHELAKIS, M. N; KOUTINAS, A. F., CARLOTTI, D. N., KOUTINAS, C., PAPADOGIANNAKIS, E. I., SPANAKOS, G. K. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. *Vet. Dermatol.* v.21, n.572-577, 2010.

SARIDOMICHELAKIS MN, KOUTINAS AF. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet. Dermatol.* v. 25, p. 61–71,2014.

SCOTT, D.W. *Small Animal Dermatology*. 6th. Philadelphia: Saunders, 1528p. 2001.

SILVA, F. M. D. F., SANTOS, E. M. D. S., TORRES, S. M., YAMASAK, E. M., RAMOS, R. A. N., & ALVES, L. C. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. *Rev. Bras. de Parasit. Vet.*, v.25, n.1, p.127-130, 2016.

SILVA, L. A. M. T. Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum*. Dissertação (Mestrado em Ciências). Fundação Oswaldo Cruz, Inst Aggeu Mag, Recife, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L., FERNÁNDEZ-BELLON, H., MORELL, P., FONDEVILA,

D., ALBEROLA, J., RAMIS, A. 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., MIRÓ G., KOUTINAS A. F., et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit & Vectors*, v. 4:86, p. 01-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO L, KOUTINAS A, MIRÓ G, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* v. 165(1–2), p. 1–18, 2009.

TAFURI, W. L., DE LIMA SANTOS, R., ARANTES, R. M. E., GONÇALVES, R., DE MELO, M. N., MICHALICK, M. S. M., & TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. methods*, v.292, p.17-23, 2004.

TORRES-NETO, R., RODRIGUES, M. M., AMORIM, R. L., CONCEIÇÃO, L. G., LUVIZOTTO, M. C. R., & FRANCO, S. R. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. *Semina: Ciênc. Agrár.*, v. 29, p. 667-676, 2008.

XAVIER SC, DE ANDRADE HM, MONTE SJH, CHIARELLI IM, LIMA WG, MICHALICK MSM, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet. Res.* v.2; p.1-7, 2006.

WERNECK GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad. Saúde Pública*,; v. 26(4), p. 644–645, 2010.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Heal Organ. p. 1–184, 2010.

WHO. Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. World Heal Organ Geneva. V. 92(38) p. 557–572, 2017.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterização histopatológica e imunohistoquímica das lesões cutâneas de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar quantitativamente o infiltrado inflamatório na pele de cães com infecção natural por *L. infantum* através do exame histopatológico;
- Avaliar qualitativamente o infiltrado inflamatório na pele de cães com infecção natural por *L. infantum* através do exame histopatológico;
- Determinar o parasitismo cutâneo de cães de cães com infecção natural por *L. infantum* através da técnica de imunohistoquímica;
- Correlacionar clinicamente a carga parasitária com as lesões e/ou sinais clínicos característicos da LVC;

CAPÍTULO I

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E DA CARGA PARASITÁRIA DE
LESÕES CUTÂNEAS ÍNTEGRAS E ULCERADAS DE CÃES COM
INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) infantum*
(NICOLLE, 1908)**

Avaliação histopatológica e da carga parasitária de lesões cutâneas de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle,1908)

RESUMO

As lesões cutâneas são os principais sinais clínicos observados em cães com leishmaniose visceral canina, sendo a pele o local de inoculação da *Leishmania infantum* nos hospedeiros susceptíveis, onde o animal pode apresentar diferentes padrões dermatológicos distintos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil histopatológico e a carga parasitária na pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Foram coletadas amostras de fragmentos de pele de 30 cães positivos no teste de triagem DPP, com diagnóstico parasitológico positivo e diagnóstico sorológico pela técnica de ELISA, sendo processados por meio do exame histopatológico. Foram encontradas formas amastigotas em 43,3% (13/30) das amostras analisadas, apesar de todos os animais terem o diagnóstico parasitológico direto confirmado. Em relação as amostras histopatológicas de lesões ulceradas 63,3% (19/30), foi encontrado padrão inflamatório granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos em 68,43% (13/19), enquanto 31,57% (6/19) dos animais apresentaram infiltrado piogranulomatoso composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Diante do exposto, pode-se concluir que a técnica do exame histopatológico pode auxiliar na quantificação do parasitismo cutâneo de cães com LVC, contudo, não deve ser utilizada como única técnica diagnóstica, uma vez que não podem ser visualizadas formas amastigotas de *L. infantum* mesmo em animais positivos na técnica do exame parasitológico direto.

Palavras-chave: Leishmaniose, cão, dermatopatia, histopatologia.

**Histopathological and parasitic load evaluation of cutaneous lesions of
dogs with natural infection by *Leishmania (Leishmania) infantum*
(Nicolle, 1908)**

ABSTRACT

Skin lesions are the main clinical signs observed in dogs with canine visceral leishmaniasis, the skin is being the site of inoculation of *Leishmania infantum* in susceptible hosts, where the animal may present different skin patterns. Therefore, the aim of this study was to evaluate the parasitism in the skin of dogs naturally infected by *L. infantum* through histopathological exam. Samples of skin fragments from 30 dogs with previous diagnosis in DPP and positive parasitological diagnosis and serological diagnosis by ELISA technique were collected and processed through histopathological examination. Amastigote forms were found in 43.3% (13/30) of the samples analyzed, although all animals had the direct parasitological diagnosis confirmed. Regarding the histopathological samples of ulcerated lesions, 63.3% (19/30), a granulomatous inflammatory pattern composed of macrophages, lymphocytes and plasma cells was found in 68.43% (13/19), while 31.57% (6/19) of the animals presented an infiltrate pyogranulomatous composed of macrophages, lymphocytes, plasma cells and neutrophils. Given the above, it can be concluded that the histopathological exam technique can help in the quantification of cutaneous parasitism in dogs with CVL, however, it should not be used as the only diagnostic technique, since amastigote forms of *L. infantum* cannot be visualized even in animals positive in the technique of direct parasitological examination.

Key-words: Leishmaniasis, dog, dermatopathy, histopathology.

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada pela *Leishmania infantum*, onde a estreita relação entre seres humanos e cães favorecem a manutenção do ciclo da *L. infantum* e torna os cães os principais reservatórios urbanos do parasita no Brasil (DANTAS-TORRES e BRANDÃO, 2006; BRITO, 2009; DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; BRASIL, 2014; LAMATTINA, 2019).

Os animais podem evoluir desde pacientes assintomáticos até apresentar várias manifestações clínicas, porém, as lesões cutâneas são, por muitas vezes, os sinais clínicos mais evidentes na LVC e possuem padrões dermatológicos distintos do ponto de vista clínico e histopatológico (FERRER *et al.*, 2008; ORDEIX, 2013; SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014; CARDOSO *et al.*, 2017; ORDEIX, 2017). A literatura relata que entre 70% e 100% dos cães infectados por *L. infantum* apresentam alguma alteração cutânea envolvida (LEAL *et al.*, 2014; SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014; CARDOSO *et al.*, 2017; LAGO *et al.*, 2019).

Sendo assim a pele representa uma excelente opção diagnóstica pelo fato de encontrar formas amastigotas de *L. infantum* através de exames parasitológicos, como a citologia esfoliativa, biópsia e imunomarcagem (TAFURI *et al.*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2011). Nesse contexto, a avaliação da carga parasitária na pele de cães sintomáticos e assintomáticos permite auxiliar na compreensão quanto ao potencial de transmissão aos hospedeiros e avaliar o parasitismo do animal infectado (SOLLANO-GALEGO *et al.*, 2004).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o parasitismo tecidual da pele íntegra e de lesões ulceradas de cães com infecção natural por *L. infantum* no estado de Pernambuco através da técnica de hematoxilina-eosina (HE).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos e animais estudados

O presente projeto possui a licença nº 1983220520/2020 do Conselho de ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foram utilizados 30 cães domiciliados, adultos, de ambos os sexos e de raças variadas, provenientes do atendimento no serviço ambulatorial de leishmanioses do Hospital Veterinário da UFRPE e do Centro de Zoonoses

do município de Petrolina, naturalmente infectados por *L. infantum* e com diagnóstico parasitológico positivo para Leishmaniose Visceral Canina. A coleta foi realizada após esclarecimento, autorização e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos tutores.

2.2 Coleta dos materiais e processamento histológico

Os animais foram submetidos à anestesia local com lidocaína 2% por via subcutânea e os fragmentos de pele foram coletados da região do cotovelo, com auxílio de um *punch* cirúrgico com diâmetro de 4 milímetros (mm). Após a coleta, foi realizada sutura padrão isolado simples com fio Nylon 3-0, limpeza e curativo da região biopsiada.

Os fragmentos coletados foram acondicionados em frascos individuais contendo solução de formalina tamponada a 10% por 48 horas para fixação e, em seguida, acondicionados em solução de álcool etílico a 70%. Posteriormente, estas amostras foram submetidas à desidratação, clarificação e incluídas em parafina. Foram realizados cortes de cinco micrômetros (μm) e as lâminas foram coradas com (HE) para posterior leitura em microscópio óptico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais do presente estudo (100%) apresentavam alguma dermatopatia como sinal clínico, corroborando com Solano-Gallego et al. (2009). Também foram encontrados resultados semelhantes nos trabalhos de Alvar et al. (2004) e Baneth et al. (2008). Contudo, estes resultados diferem de Figueiredo et al. (2009), que afirmaram que lesões cutâneas não são sinais clínicos frequentes de cães com LVC. Xavier et al. (2006) afirma que o processo inflamatório da pele de cães infectados por *L. infantum* está presente em diversas localizações da pele íntegra ou ulcerada, com sua intensidade variável de acordo com os sinais clínicos apresentados pelos animais acometidos pela LVC.

No presente trabalho houve predominância do padrão descamativo em 100% (30/30) das lesões. Ferrer e seus colaboradores (1988) afirmam que os cães acometidos com LVC podem apresentar diferentes padrões dermatológicos, corroborando com o que foi encontrado no presente estudo. De acordo com os achados clínicos, 63,3% (19/30) dos animais apresentavam

lesões ulcerativas em diferentes regiões da pele, o que difere de Scott *et al.* (2001), que relata que a dermatite esfoliativa é um achado predominante ao padrão ulcerativo. Ridley e Ridley (1983) destacam que as lesões ulcerativas na LVC advêm da liberação dos parasitos que estavam inoculados dentro dos macrófagos que se romperam na derme, causando intensa reação inflamatória.

Todas as lesões ulcerativas estavam presentes em áreas de projeções ósseas, corroborando com Ferrer e seus colaboradores (1988) e Silva e seus colaboradores (2016), que afirmaram que essas áreas de projeções ósseas são mais comumente envolvidas em padrões ulcerativos, onde Torres-Neto (2008) afirma que este achado pode ser justificado pela isquemia relacionada à vasculite somada a pressão nos pontos de apoio.

No que se refere ao padrão dermatológico ulcerativo, houve predominância da carga parasitária severa em relação ao parasitismo moderado e leve, o que também foi relatado por Giunchetti *et al.*, (2006), que avaliou cães sintomáticos e assintomáticos infectados pela *L. infantum*. Entretanto, o mesmo não foi encontrado por Saridomichelakis *et al.* (2007), onde a relação entre a carga parasitária e a severidade das lesões cutâneas observadas macroscopicamente não foi evidenciada, divergindo dos resultados encontrados nesta pesquisa.

Em relação as amostras histopatológicas, foi encontrado padrão inflamatório granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos em 68,43% (13/19), enquanto 31,57% dos animais apresentaram infiltrado piogranulomatoso composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, corroborando com França e seus colaboradores (2016). Estes dados diferem de Baneth *et al.* (2006), Costa *et al.* (2008) e Calabrese *et al.* (2010), que afirmaram que pode ser encontrado predominantemente infiltrado inflamatório piogranulomatoso na pele com macrófagos com presença de formas amastigotas, apresentando pequeno número de linfócitos e plasmócitos.

Macrófagos, linfócitos e células plasmáticas foram as células predominantes nas amostras avaliadas por meio da histopatologia, o que também foi observado por Ordeix *et al.* (2017) e corrobora com Scott *et al.* (2001), que relata que *L. infantum* pode infectar muitos tipos celulares, incluindo células do sistema fagocítico mononuclear, onde essas células infectadas são

as células apresentadoras de antígenos, o que vai estimular o tipo de resposta imune predominante no animal, como afirma Reis *et al.* (2009).

Saridomichelakis e Koutinas (2014) afirmaram que o exame histopatológico pode ser uma boa alternativa como método diagnóstico da LVC em cães com lesões cutâneas, porém, no presente estudo, o exame histopatológico detectou formas amastigotas de *Leishmania sp.* em 43,3% (13/30) das amostras analisadas. A avaliação imuno-histoquímica pode auxiliar na detecção de formas amastigotas que não foram identificadas no exame histopatológico, como afirma Queiroz *et al.* (2011). Os diferentes graus de parasitismo cutâneo nas amostras analisadas pela histopatológico podem ser justificados pelo tipo de resposta imune local associada a suscetibilidade de infecções secundárias, como afirmam Souza-Lemos *et al.* (2008).

4. CONCLUSÃO

Diante do exposto com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a técnica do exame histopatológico pode auxiliar na quantificação da carga parasitária, reforçando a importância da pele como reservatório de formas amastigotas de *L. infantum*, com destaque para a pele íntegra, que mesmo sem lesão macroscópica pode favorecer a transmissão da doença. Porém, não deve ser utilizada como única técnica diagnóstica, uma vez que não podem ser visualizadas formas amastigotas de *L. infantum* mesmo em animais positivos na técnica do exame parasitológico direto.

5. REFERÊNCIAS

- ALVAR, J., VÉLEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS. ONE*. V. 7(5): e35671. pmid:22693548, 2012.
- BANETH, G. KOUTINAS, A. F., SOLANO-GALLEGO, L., BOURDEAU, P., & FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trend. in Parasitol.*, v. 24, p. 324-330, 2008.
- BRASIL. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde, Dep. de Vig. Epidemiol. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; MAIA, F.C.L.; SANTOS, E.S.C.; LAUS, J.L.; MEUNIER, I.M.J.; Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Arq. Brasil. de Med. Vet. e Zootec.*, Belo Horizonte, v.58, n.5, p. 768-776, 2004.
- CALABRESE, K. S., CORTADA, V. M. C. L., DORVAL, M. E. C., LIMA, M. S., OSHIRO, E. T., SOUZA, C. S. F., & ABREU-SILVA, A. L. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. *Exp. Parasitol.*, v. 124, p. 253-257, 2010.
- CARDOSO, J. M. D. O. Tratamento da leishmaniose visceral canina empregando duas abordagens terapêuticas distintas: quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal e imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2018.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.*, v. 141, p. 539-543, 1997.
- COSTA, M. M. S., LIMA, W. G., FIGUEIREDO, M. M., MICHALICK, M. S. M., TAFURI, W. L. Cervical, mandibular, and parotid lymphonodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Vet. Pathol.*, v. 45, p. 613-616, 2008.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil:

revisiting the paradigms of epidemiology and control. *Rev. do Inst. de Med. Trop. de São Paulo*, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 151-156, May/June 2006.

DE QUEIROZ N.M.G.P., DA SILVEIRA R.C.V., DE NORONHA A.C.F. Jr, OLIVEIRA T.M.F.S., MACHADO R.Z., STARKE-BUZETTI W.A.. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. *Vet. Parasitol.* v. 178, p.1-8, 2011.

FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. of Sm. Anim. Pract.*, v. 29, p. 381-388, 1988.

GEISWEID K, MUELLER R, SAUTER-LOUIS C. Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. *Vet Rec.* v.171, p.399, 2012.

GIUNCHETTI, RC.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, CM.; CORREAOLIVEIRA, R. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Pathol.* v. 135, p.100–107, 2006.

LAGO, J. et al. Clinical and histopathologic features of canine tegumentary leishmaniasis and the molecular characterization of *Leishmania braziliensis* in dogs. *Plos. Negl. Trop. Dis.*, v. 13, n. 7, p. 1-14, 2019.

LAMATTINA D, BERROZPE PE, CASAS N, MOYA SL, GIULIANI MG, COSTA SA, et al. Twice upon a time: The progression of canine visceral leishmaniasis in an Argentinean city. *PLoS ONE* 14(7): e0219395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219395>, 2019.

LEAL, G. G. de A. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, v. 205, p. 472-482. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714004762>>, 2014.

MARCONDES, M. Leishmaniose. In: LARSSON, C.E & LUCAS, R. *Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária* – 2 ed. São Caetano do Sul, São Paulo. Interbook, 2020.

ORDEIX L, SOLANO-GALLEGU L, FONDEVILA D ET AL. Papular dermatitis due to *Leishmania spp.* infection in dogs with parasite specific cellular immune responses. *Vet. Dermatol.* v.16, p.187–191, 2005.

ORDEIX L, FONDATI A. Manifestaciones clínicas cutáneas. In: Solano-Gallego L, editor. *Leishmaniosis canina. Una revisión actualizada.* ed. Zaragoza: Servet. p. 69–95, 2013.

REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R. C., GUERRA, L. L., CARVALHO, M. D. G., MAYRINK, W., & MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. & Exp. Immunol.*, v. 146, p. 303-311, 2006.

RIDLEY, D.S; RIDLEY, M. The Evolution of lesions in cutaneous leishmaniasis. *J. of Pathol.*, v.141, p. 83-96, 1983.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Dermatol.*, v. 18, p. 227-233, 2007.

SARIDOMICHELAKIS, M. N; KOUTINAS, A. F., CARLOTTI, D. N., KOUTINAS, C., PAPADOGIANNAKIS, E. I., SPANAKOS, G. K. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniasis associated with *Leishmania infantum*. *Vet. Dermatol.* v.21, n.572-577, 2010.

SARIDOMICHELAKIS MN, KOUTINAS AF. Cutaneous involvement in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet. Dermatol.*; 25:61–71, 2014.

SCOTT, D.W. *Small Animal Dermatology.* 6th. Philadelphia: Saunders. 1528p, 2001.

SILVA, F. M. D. F., SANTOS, E. M. D. S., TORRES, S. M., YAMASAK, E. M., RAMOS, R. A. N., & ALVES, L. C. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. *Rev. Brasil. de Parasitol. Vet.*, v.25, n.1, p.127-130, 2016.

SOLANO-GALLEGU, L., FERNÁNDEZ-BELLON, H., MORELL, P., FONDEVILA,

D., ALBEROLA, J., RAMIS, A. 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, KOUTINAS A, MIRÓ G, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* v. 165(1–2) p. 1–18, 2009.

TAFURI, W. L., DE LIMA SANTOS, R., ARANTES, R. M. E., GONÇALVES, R., DE MELO, M. N., MICHALICK, M. S. M., & TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. of immunol. Meth.*, v.292, p.17-23, 2004.

TORRES-NETO, R., RODRIGUES, M. M., AMORIM, R. L., CONCEIÇÃO, L. G., LUVIZOTTO, M. C. R., & FRANCO, S. R. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. *Semina: Ciênc. Agr.* v. 29, p. 667-676, 2008.

XAVIER SC, DE ANDRADE HM, MONTE SJH, CHIARELLI IM, LIMA WG, MICHALICK MSM, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania infection* in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res.* v.2; p.1-7, 2006.

CAPÍTULO II

EVALUATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF *Leishmania infantum* IN DIFFERENT PATTERNS OF DOG SKIN MANIFESTATIONS

Evaluation of immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in different patterns of dog skin manifestations

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CANL) is a zoonotic disease of huge impact on public health and the skin of infected dogs has been an excellent tissue for detection of amastigote forms of *L. infantum*. The goal of this study was to apply the immunohistochemistry (IHC) for the diagnosis of CANL in different patterns of dog 'skin manifestations. Thirty dogs naturally infected with *L. infantum* were used after clinical evaluation and diagnostic confirmation by bone marrow biopsy. The animals came from the Veterinary Hospital of Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife or from Zoonosis Centre from Petrolina county, Pernambuco and were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the UFRPE. Dogs examinations were subjected to a clinical exam with an emphasis a systemic signs and each clinical parameter was classified according to its severity. skin fragments were removed by biopsy for histological and immunohistochemical processing. According to the results, all dogs exhibited clinical signs of skin lesion, related to CanL. The exfoliative (30/30) and ulcerative (19/30) dermatitis were, respectively, the most commonly diagnosed. Nodular lesions in the skin were represented by only one dog (1 of 30 or 3,33%). IHC technique showed amastigote forms of *Leishmania* parasites within macrophages in 43,3% (13/30) by using the streptavidin-biotin immunohistochemical method. All the positive samples were collected from animals that presented an ulcerative and desquamative dermatitis. Immunostaining was observed in 43,33% (13/30) of animals with ulcerative dermatitis in place of those that presented only exfoliative dermatitis without any other associated dermatological pattern (8/30), where there was no positive

reaction. Based on the results in the present study the immunohistochemistry methodology is a complementary method that can be applied in symptomatic dogs presented ulcerative and desquamative dermatitis.

Key-words: Canine leishmaniasis, dermatopathy, immunohistochemistry.

1.INTRODUCTION

Canine leishmaniosis (CanL) is caused by a protozoa parasite of the specie *Leishmania infantum* endemic in Brazil areas. The clinical manifestations of CVL are not specific (NUNES et al., 2016) and skin lesions are the most frequent clinical sign (SARIDOMICHELAKIS e KOUTINAS, 2014).

These signs may vary but may include anemia, local or generalized skin lesions, weight loss, lethargy and eye lesions (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; GEISWEID et al., 2012; FREITAS et al., 2017), enlargement of popliteal lymph nodes (GIUNCHETTI et al, 2006), and abnormal nails (onychogryposis) (BANETH et al., 2008).

Among the clinical manifestations of CanL, skin diseases are the most frequently clinical signs in 80% to 90% of animals (ORDEIX et al., 2005), manifesting not a linear pattern of the skin (Ferrer et al., 1988). The skin also represents a highly sensitive tissue for the detection of amastigote forms of *L. infantum* due to the high cutaneous parasitism of the infected animal (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS, 2010).

The dog's skin is the first site to be infected with promastigotes of *L. infantum* by the vector and these dogs become a reservoir of *L. infantum* letting an easy transmission (TRAVI et al., 2001) and because the high cutaneous parasitism of represents a highly sensitive tissue for the detection of amastigote forms of *L. infantum* (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS, 2010).

Histochemical techniques of dogs skin revealed strong inflammatory infiltrate of type III and type I of collagen fibrils revealing deep structural changes in collagenous components of the extracellular matrix of the skin (GIUNCHETTI et al., 2006).

Although only 20% of these animals showed parasites in the skin (BANETH et al., 2008) and the absence result by the exfoliative cytology of skin does not mean

negative animal.

Parasitological direct identification and isolation of the parasite in culture from different clinical samples are among the parasitological methods routine (BRASIL, 2006). On the other hand, skin immunohistochemistry with specific anti-*Leishmania* antibodies contributes to the diagnosis of CanL.

The aim of this study was to apply the immunohistochemistry (IHC) for the diagnosis of CANL in different patterns of dog 'skin manifestations.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals and ethical aspects

Thirty dogs naturally infected with *L. infantum* were used after clinical evaluation and diagnostic confirmation by bone marrow biopsy. The animals were brought to the Veterinary Hospital of Rural University of Pernambuco, Recife during the study period, or they are from Zoonosis Centre from Petrolina county, Pernambuco. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal Rural University of Pernambuco (#1983220520/2020).

2.2 Clinical examination of and classification of cutaneous lesions

Dogs examinations were subjected to a clinical exam with an emphasis a systemic signs as weight loss, hyperthermia, lymphadenopathy, skin disease, onychogryphosis and ocular signs related with CANL. Each clinical parameter was classified according to its severity on a numerical scale from 0 to 2, as follows: 0, absent; 1, local 2, generalized (ROUGIER 2012).

2.3 Collection of skin biopsy and immunohistochemical processing

All the animals were submitted to local anesthesia with 2% lidocaine by subcutaneous via. After that, a 4 mm diameter punch biopsy of skin were obtained from the elbow region in all animals, followed by a simple suture with a 3-0 monofilament nylon thread. The wounds were cleaned daily with saline solution, and an occlusive dressing with gauze was applied.

All samples were placed in individually identified flasks containing 10% buffered formalin. for 48 hours and after the fixation, the tissues were placed into

70% ethanol. Subsequently, a typical dehydration sequence for specimens of 5mm thick and infiltration with histological wax were performed.

2.4 Immunohistochemical method for labeling amastigote forms of *L. infantum* (TAFURI et al, 2004)

Deparaffined slides were hydrated and incubated in 4% hydrogen peroxide followed by incubation with normal goat. A heterologous hyperimmune serum from one dog naturally infected with *L. infantum* was used as primary antibody. Slides were incubated from 18 to 22 h at 4 8C in a humid chamber. After washing in PBS, the slides were incubated with biotinylated goat antimouse and anti-rabbit (Link-DAKO, LSAB2 Kit, Catalog # KO675-1; Carpinteria, California, USA), washed in PBS again, and then incubated with the streptavidin–peroxidase complex (DAKO, LSAB2 Kit, Catalog # K0675-1; Carpinteria, California, USA) for 20 min each at room temperature. The reaction was developed with a 0.024% diaminobenzidine (DAB; Sigma, St. Louis, USA) solution and 0.16% hydrogen peroxide 40 vv. Finally, slides were dehydrated, cleared, counter-stained with Harris' Hematoxylin, and mounted with coverslips.

3.RESULTS AND DISCUSSION

All dogs exhibited clinical signs of skin lesion, related to CanL. The exfoliative (30/30) and ulcerative (19/30) dermatitis were, respectively, the most commonly diagnosed. Nodular lesions in the skin were represented by only one dog (1 of 30 or 3,33%). The skin is considered the more important tissue reservoir of parasite multiplication in VCL (SOLANO-GALLEGO ET AL., 2001; SOLANO-GALLEGO ET AL., 2004) and dermatitis has been defined as an inflammatory response of the skin which one is the main clinical signs of CanL according to Figueiredo; Cardoso (2018).

At the clinical examination the dogs have at least one of the dermatological patterns described by Ferrer et al., (1988). Skin diseases are the most frequently clinical signs in 80% to 90% of animals (ORDEIX et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS et. al., 2010), manifesting not a linear pattern of the skin (FERRER et al., 1988).

In this context, it should be taken into account that the animals included in this study were from natural infection, and showed histological, parasitological, and immunological different patterns of clinical stages and evolution of the disease

(RIBEIRO et al., 2018)

The disease severity staged by using a numeric value showed local and generalized. This is an important point because skin lesions observed in dogs have been associated with the ability to transmit *L. infantum* to the sand fly population (TRAVI et al., 2001; DA COSTA et al., 2006).

In the same way dogs presented clinical manifestations particularly skin lesions the skin's odour is significantly more attractive to blood-seeking female sand flies (STANIEK and HAMILTON, 2021) and represent a risk for transmission of *L. infantum* in endemic areas (VERCOSA et al., 2008).

IHC technique showed amastigote forms of *Leishmania* parasites within macrophages in 43,3% (13/30) by using the streptavidin-biotin immunohistochemical method. All the positive samples were collected from animals that presented an ulcerative and desquamative dermatitis. These results indicate that the association of ulcerative and desquamative dermatitis may lodge a high parasite load of *Leishmania* parasites, which can support the diagnosis by the immunohistochemical test.

On the other hand, immunostaining was observed in 43,33% (13/30) of animals with ulcerative dermatitis in place of those that presented only exfoliative dermatitis without any other associated dermatological pattern (8/30), where there was no positive reaction

These results are similar to Giunchetti et al. (2006), which detected only 53,33% amastigote forms of *Leishmania* within macrophages from symptomatic dogs presented localized ulcers and diffuse ulcers.

According to Ferrer *et al.* (1988) and De Queiroz *et al.* (2011) the streptavidin-biotin immunohistochemical method increases the predictive value of the histopathological exam but they may be influenced by the frequency of amastigote forms in the skin. By this way the immunohistochemical technique presenting high sensitivity and specificity, being used for diagnostic confirmation even when the parasite load is low (Tafari et al., 2004; Ramos-Vara, 2008; Maia and Campino, 2008)

Several elements are responsible for the dissemination of *L. infantum* to different places of the dogs (COLMENARES et al., 2002). Nevertheless, skin parasitism is the late event during the CANL (TAFURI et al., 2001; TRAVI et al., 2001). A severe parasite load have been detected in ulcerated skin samples in

CANL (SILVA et al., 2016).

4. CONCLUSIONS

Based on the results in the present study the immunohistochemistry methodology is a complementary method that can be applied in symptomatic dogs presented ulcerative and desquamative dermatitis.

5. REFERENCES

BANETH, G. KOUTINAS, A. F., SOLANO-GALLEGO, L., BOURDEAU, P., & FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trend. in Parasitol.*, v. 24, p. 324-330, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: *Ministério da Saúde*; 2006.

CARDOSO, J. M. D. O. Tratamento da leishmaniose visceral canina empregando duas abordagens terapêuticas distintas: quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal e imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2018.

COLMENARES, M., KAR, S., GOLDSMITH-PESTANA, K., McMAHON-PRATT, D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Transact. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.* (Suppl. 96), S3–S7, 2002.

DA COSTA-VAL A.P., CAVALCANTI, R.R., DE FIGUEIREDO G. N., MICHALICK, M.S., ALEXANDER B., WILLIAMS, P., MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet. J.* v. 174(3), p. 636-43, 2007.

DE QUEIROZ N.M.G.P., DA SILVEIRA R.C.V., DE NORONHA A.C.F. Jr, OLIVEIRA T.M.F.S., MACHADO R.Z., STARKE-BUZETTI W.A.. Detection of

Leishmania (L.) chagasi in canine skin. *Vet. Parasitol.* v. 178, p.1-8, 2011.

FERRER, L. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. of Small Anim. Pract.*, v. 29, p. 381-388, 1988.

FIGUEIREDO, FB & MADEIRA, MF. Os parasitas e a questão da infecção em animais domésticos e domiciliados. In Fátima Conceição, Carlos Roberto Alves. Leishmanioses do Continente Americano. Rio de Janeiro. *Editores Fiocruz*. p. 259-273, 2014.

FREITAS, M. V. D. M., BRUN, C. F. D. L., RODRIGUES, M. C., ALVES, G. B. B., LEAL, A. F., GROLLI, L., & QUESSADA, A. M. Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil. *Ciênc. Rur.*, v.47, 2017.

GIUNCHETTI, RC.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, CM.; CORREA OLIVEIRA, R. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp. Pathol.* v. 135, p.100–107, 2006.

MAIA, C. & CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasit.* n. 4, v. 158, p. 274–287, 2008.

NUNES, J.B.; LAURENTI, M.D.; KANAMURA, H.Y.; PEREIRA, A.A.C.; COLOMBO, F.A.; MARQUES, M.J. *Leishmania infantum* infection in dogs from the southern region of Minas Gerais state, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 58, 2016.

ORDEIX L, SOLANO-GALLEGO L, FONDEVILA D ET AL. Papular dermatitis due to *Leishmania spp.* infection in dogs with parasitespecific cellular immune responses. *Vet. Dermatol.* v.16, p.187–191, 2005.

PAPADOGIANNAKIS, E. I. et al. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet. Immunol. and immunopathol.*, v. 104, p. 227-237, 2005.

RAMOS-VARA JA, KIUPEL M, BASZLER T, BLIVEN L, BRODERSEN BW, CHELACK B. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest.* v.20; p.393-413, 2008.

RIBEIRO, R. R., MICHALICK, M.S.M., DA SILVA M.E., DOS SANTOS C.C.P., FRÉZARD F.J.G., DA SILVA S.M. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed. Res. Int.* v. 2018, p. 1-12, 2018.

ROUGIER, S., HASSEINE, L., DELAUNAY, P., MICHEL, G., MARTY, P. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Vet.Parasitol.* v. 186, p. 245-253, 2012.

SARIDOMICHELAKIS, M. N; KOUTINAS, A. F., CARLOTTI, D. N., KOUTINAS, C., PAPADOGIANNAKIS, E. I., SPANAKOS, G. K. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. *Vet. Dermatol.* v.21, n.572-577, 2010.

SARIDOMICHELAKIS MN, KOUTINAS AF. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet. Dermatol.* v. 25, p. 61–71, 2014.

SILVA, F.M., SANTOS, E.M., TORRES, S.M., YAMASAK, E.M., RAMOS, R.A., ALVES, L.C. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.25(1), p. 127-30, 2016.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*- specific IGG, IGG1 and IGG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.*, v. 96, p. 265-276, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J. of Comp. Pathol.*, v. 130, p. 7-12, 2004.

STANIEK, M.E., HAMILTON, J.G.C. Odour of domestic dogs infected with *Leishmania infantum* is attractive to female but not male sand flies: Evidence for parasite manipulation. *PLoS Pathog.* V. 17, p. (3), 2021.

TAFURI, W.L., DE OLIVEIRA, M.R., MELO, M.N., TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.* V.96 (3), p. 203–212, 2001.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. of Immunol. Meth.*, v. 292, p. 17-23, 2004.

TRAVI, B. L.; C. TABARES, J.; Cadena, H.; Ferro, C.; Osorio, Y. Canine Visceral Leishmaniasis in Colombia: Relationship between Clinical and Parasitological Status and Infectivity for Sand Flies,” *The Amer. J. of Trop. Med. and Hyg.*, Vol. 64, No. 3-4, p. 119-124, 2001.

VERÇOSA, B., LEMOS, C., MENDONÇA, I. *et al.* Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet. Res.* V. 4, p. 45, 2008.

5.CONCLUSÕES GERAIS

- A técnica do exame histopatológico pode auxiliar na quantificação do parasitismo cutâneo de cães com LVC como uma das técnicas diagnósticas, uma vez que não podem ser visualizadas formas amastigotas de *L. infantum* mesmo em animais positivos na técnica do exame parasitológico direto;
- A imunomarcção das formas amastigotas de *L. Infantum* foi determinada pelo tipo de padrão dermatológico apresentado (dermatite ulcerativa), podendo auxiliar para a caracterização clínica e diagnóstica da Leishmaniose Visceral Canina.

ANEXO 1

Animal	D. esfoliativa	D. ulcerativa	D. pustular	D. nodular
R1	1			
R2	2	1		1
R3	1	1		
R4	2			
R5	1	1		
R6	2			
R7	1			
R8	2	2		
R9	1			
R10	1			
R11	1			
R12	2			
R13	1			
P1	1			
P2	1			
P3	1			
P4	2	2		
P5	2	1		
P6	2	2		
P7	2	2		
P8	2	2		
P9	2	2		
P10	2	2		
P11	2	2		
P12	2	2		
P13	2	2		
P14	2	2		
P15	2	2		
P16	2	2		
P17	2	2		

ANEXO 2



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da carga parasitária das lesões inflamatórias cutâneas de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle,1908)", protocolada sob o CEUA nº 1983220520 (06/06/2020), sob a responsabilidade de **Leucio Camara Alves** e equipe; *Letícia Maximiano Bezerra; Edna Michelly de Sá Santos; Winny Gomes de Oliveira Silva; Janilene de Oliveira Nascimento; Roseane Oliveira Feltosa; Wagner Wesley Araujo Andrade; MARIA VANUZA NUNES DE MEIRELES; Talita Nayara Bezerra Lins; Carlos Adriano de Santana Leal; Rafael Antonio do Nascimento Ramos; Cassia de Freitas; Caio Felipe Cavalcanti de Andrade Gomes; Maria de Lara Oliveira Lima* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFPRPE) na reunião de 10/06/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the parasitary load of cutaneous inflammatory injuries of dogs with natural infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle,1908)", utilizing 30 Dogs (males and females), protocol number CEUA 1983220520 (06/06/2020), under the responsibility of **Leucio Camara Alves** and team; *Letícia Maximiano Bezerra; Edna Michelly de Sá Santos; Winny Gomes de Oliveira Silva; Janilene de Oliveira Nascimento; Roseane Oliveira Feltosa; Wagner Wesley Araujo Andrade; MARIA VANUZA NUNES DE MEIRELES; Talita Nayara Bezerra Lins; Carlos Adriano de Santana Leal; Rafael Antonio do Nascimento Ramos; Cassia de Freitas; Caio Felipe Cavalcanti de Andrade Gomes; Maria de Lara Oliveira Lima* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFPRPE) in the meeting of 06/10/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 08/2020 a 07/2022 Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **01 a 15 anos**

N: **30**

Linhagem: **TODAS AS RAÇAS**

Peso: **01 a 60 kg**

Local do experimento: O experimento será realizado no Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

Recife, 01 de julho de 2020

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite de Souza
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guarani
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

ANEXO 3



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar do projeto de mestrado intitulado "AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DAS LESÕES INFLAMATÓRIAS CUTÂNEAS DE CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) infantum* (NICOLLE, 1908)", sob a responsabilidade do pesquisador Prof^o Dr^o Leacio Camara Alves. Sua participação com seu animal particular é voluntária e se dará por meio de coletas de fragmento de pele através de biópsia excisional com auxílio de punch 4mm descartável, com realização de anestesia local e provável anestesia geral, desde que o paciente esteja apto para o procedimento. Serão prescritos fármacos para analgesia e ação anti-inflamatória e antisséptica a serem realizados em domicílio, além de uso do colar elisabetano durante 10 dias, quando seu animal será reavaliado clinicamente antes da retirada dos pontos.

Todo procedimento anestésico possui risco, todavia os riscos decorrentes da participação dos seu (s) animal (is) na pesquisa são mínimos. Se você aceitar participar, os resultados decorrentes do estudo com seu (s) animal (is) possibilitará a elaboração de estratégias de controle mais efetivas e diminuindo os riscos de infecção a animais e humanos.

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem prejuízo a sua pessoa.

O (a) Sr (a) não terá despesas e também não receberá remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade e de seu (s) animal (is) não serão divulgadas, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço Rua Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos, Recife - PE, pelo telefone (81) 3320-6422.

Consentimento Pós-Infomação

Eu, _____, fui informado sobre o projeto "Avaliação da carga parasitária das lesões inflamatórias cutâneas de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)" que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Este documento foi emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do participante
Impressão do dedo polegar caso não saiba assinar

ANEXO 4

FICHA DE ATENDIMENTO LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

DATA: ___/___/___ Veterinário responsável: _____

1. IDENTIFICAÇÃO – PACIENTE

Nome: _____ Idade: _____ Raça: _____

Sexo: () F () M Procedência: _____

1. IDENTIFICAÇÃO – TUTOR:

Nome: _____

Contato: _____ CEP: _____ - _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

2. EXAME FÍSICO

FC: _____ FR: _____ Mucosas: _____

DERMATOLÓGICO

Alopecia () ausente () local () generalizada

Onicogribose () ausente () presente _____

Paroníquia () ausente () presente _____

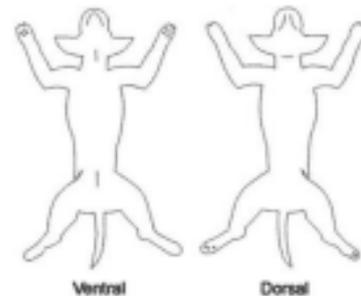
D. descamativa () ausente () local () generalizada

D. ulcerativa () ausente () local () generalizada

D. nodular () ausente () local () generalizada

D. papular () ausente () local () generalizada

D. pustular () ausente () local () generalizada



Sinais oculares (conjuntivite, uveíte, hifema, úlcera, KCS) () Não () Sim _____

Sinais gastrintestinais (vômito, diarreia) () Não () Sim _____

Sinais articulares: () Não () Sim _____

Distúrbios miccionais: () Não () Sim _____

Linfadenomegalia: () ausente () local () generalizada _____

Apetite: () anorexia () hiporexia () normorexia () polifagia

Epistaxe: () Não () Sim

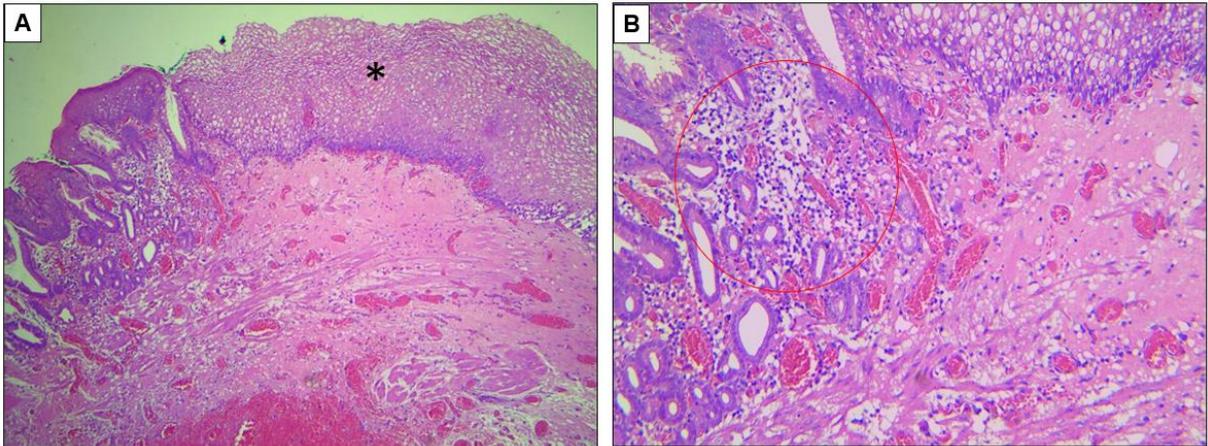
Médula óssea: () Não () Sim () esternal () crista ilíaca () Positivo () Negativo

Linfonodos: () Não () Sim _____ () Positivo () Negativo

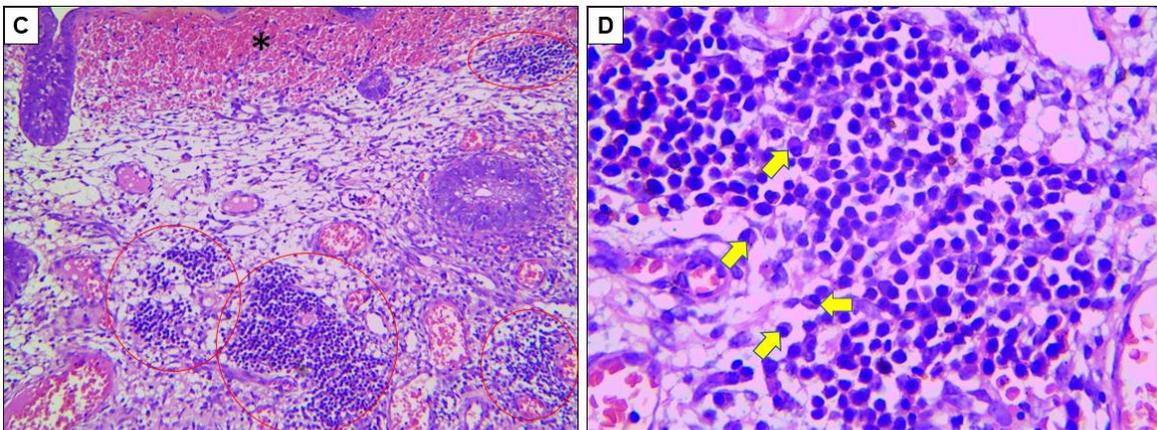
Pele: () Não () Sim () íntegra () lesionada () Positivo () Negativo

Sangue: () Não () com EDTA () sem EDTA

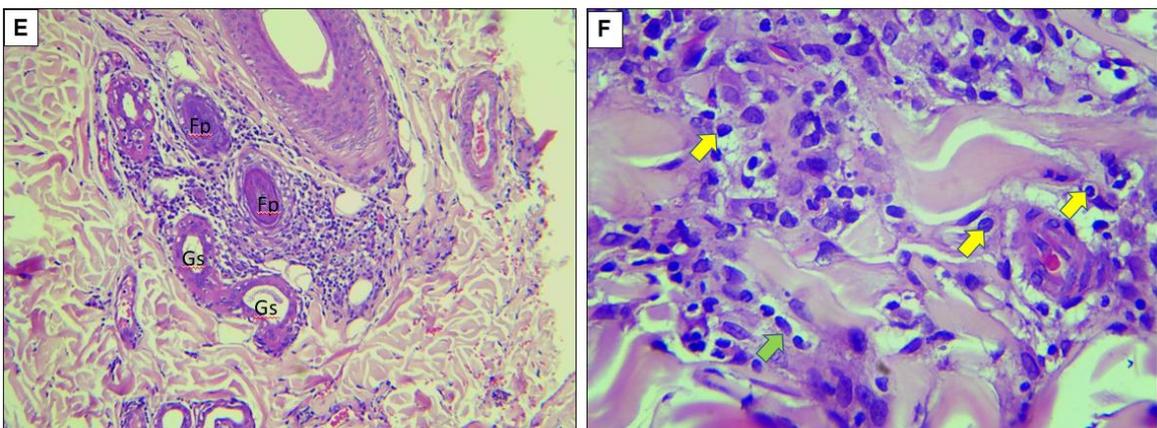
ANEXO 5



A. Pele da região de cotovelo, apresentando hiperparaqueratose (asterisco). B. Constata-se na derme superficial, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear. Coloração H.E. AU 200X e 400X.



C. Pele da região de cotovelo, apresentando vários focos de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear por toda derme (círculos) e intensa vascularização na derme superficial (asterisco). D. Constata-se na derme profunda presença de predominante de linfócitos e alguns plasmócitos (setas) Coloração H.E. AU 200X e 400X.



E. Pele da região de cotovelo, apresentando intenso infiltrado inflamatório próximos aos folículos pilosos (Fp) e glândulas sudoríparas (Gs) predominantemente mononuclear. F. Constata-se na derme profunda, presença de linfócitos (setas amarelas) e plasmócito (seta verde). Coloração H.E. AU 200X e 400X.