



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica da pele de cães
(*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) com infecção natural por
Leishmania infantum (Nicolle, 1908)**

EDNA MICHELLY DE SÁ SANTOS

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

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE – PE

2012

Ficha catalográfica

S237a Santos, Edna Michelly de Sá
Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica da pele de cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) com infecção natural por *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908) / Edna Michelly de Sá Santos. – Recife, 2012.
43 f. : il.

Orientador: Leucio Câmara Alves.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2012.
Referências.

1. Leishmaniose visceral canina 2. Dermatopatia
3. Diagnóstico 4. Clínica de pequenos animais I. Alves,
Leucio Câmara, orientador II. Título

CDD 636.708969

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

Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica da pele de cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) com infecção natural por *Leishmania infantum* (Nicolle, 1908)

Dissertação de Mestrado elaborada e defendida por

EDNA MICHELLY DE SÁ SANTOS

Aprovada em 28 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR:



Prof. Dr. Leucio Câmara Alves
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

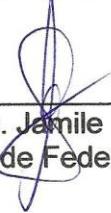
EXAMINADORES:



Profa. Dra. Regina Ramadinha
Instituto de Veterinária/UFRRJ



Dra. Nair Cavalcanti Lira
Médica Veterinária Autônoma



Profa. Dra. Jamile Prado dos Santos
Universidade Federal do Piauí/CPCE

*Aos meus queridos pais, Sandra e Edmilson,
por todo amor incondicional e pela confiança.*

*À minha Mãe Nena, pela dedicação e por estar presente em todas as horas.
Por nunca ter medido esforços em prol da minha jornada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a luz da vida;

Aos meus pais, Edmilson e Sandra, por terem feito a minha vida lindamente possível;

À minha tia Edna, Mãe Nena, por ter estado sempre por perto, mesmo longe;

Ao meu irmão, Nelson, por todos os anos de convivência, alegria e conversas profissionais;

Ao meu querido amigo, Pedro Monteiro Jr., meu companheiro e meu parceiro, por estar presente em cada passo, apoiando e aplaudindo cada decisão;

A Leninsk Vicenzi, por todo amor e carinho que me dedica. Pela paciência de um anjo e por acreditar na minha capacidade;

Ao Prof. Dr. Leucio Câmara Alves, o prof., pelo conhecimento, pela confiança, pelas conversas, pelos conselhos, por ter sido, não apenas meu orientador, mas meu grande amigo.

À Profa. Dra. Regina Ramadinha, a Rê, por ter me recebido de braços abertos, por estar sempre sorrindo e por ter tornado possível um dos momentos mais felizes da minha vida, minha Residência.

Aos meus amigos, Samantha e Thiago, por terem sido essenciais, extrapolando os limites da graduação, sempre prontos para ouvir e estar presentes a qualquer hora;

À minha amiga, Renata, comadre, afilhada e parceira de todas as horas. Foram muitos momentos engraçados, cansativos, chuvosos, ensolarados, mas inesquecíveis.

Às minhas amigas cariocas, Sylvinha, Mari Mariana, Dani, Paty e Eri, pelo caráter, pelo carinho e por tudo que cada uma sabe que me acrescentou como pessoa e como profissional;

Aos meus amigos recifenses, Carina, Júlio, Hévila Vai, Bodocó, Bini, Marco Granja, Flávia, Maaaaa, Bekinha, Fê, Rafael e Nadine, por fazerem o meu dia mais divertido, mais amado e mais científico;

Aos animais utilizados no meu experimento que contribuíram para a execução deste trabalho, sem mesmo terem o poder do consentimento;

Aos meus felinos e caninos, que me recebem lindamente cada vez que chego em casa, após um dia cheio de trabalho;

À UFRPE e a todos os profissionais que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação;

Ao CNpQ e à FACEPE pelo apoio financeiro.

RESUMO

Leishmaniose visceral canina é uma doença sistêmica causada pela *Leishmania infantum*. O cão geralmente apresenta uma variedade de sinais clínicos que incluem anorexia, perda de peso, linfadenopatia generalizada, porém as lesões cutâneas são os mais encontrados. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações histopatológicas e detectar formas amastigotas através da imuno-histoquímica na pele de cães com infecção natural por *L. infantum*. Fragmentos de pele normal e ulcerada de 22 cães positivos foram coletados, fixados em formol e processados para histopatologia e imuno-histoquímica. Dois grupos de animais foram utilizados: o primeiro foi composto por 12 cães com teste ELISA e biópsia de medula óssea positivos (Grupo 1) e o segundo composto por 10 cães positivos somente por teste ELISA (Grupo 2). Os resultados da imuno-histoquímica mostraram formas amastigotas em 91,67% (11/12) dos animais do Grupo 1, enquanto nenhum (0/10) dos cães do Grupo 2 foi positivo na mesma técnica. Com relação ao padrão histopatológico da pele íntegra, foram observados dermatite nodular, perifolicular, difusa e da interface em 9,1% (1/11), cada uma, dermatite liquenóide em 27,3% (3/11), dermatite perianexial em 18,2% (2/11) e dermatite mista (nodular e perifolicular) em 9,1% (1/11) dos cães. A avaliação histopatológica mostrou infiltrado celular granulomatoso com presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos em 90,9% (10/11), enquanto 9,1% (1/11) da pele de saudável não mostraram alterações. Por outro lado, o padrão histopatológico da pele ulcerada revelou dermatite perifolicular e perianexial em 9,1% (1/11), cada uma; dermatite liquenóide em 18,2% (2/11), dermatite difusa em 27,3% (3/11) e 36,4% (4/11) de dermatite mista (interface e perivascular profunda; intersticial e perianexial; interface e perianexial; intersticial, perivascular superficial e perianexial). Com relação a avaliação histológica da pele ulcerada, foi observada infiltração celular granulomatosa composta por macrófagos, linfócitos e plasmócitos em 81,8% (9/11) e infiltração celular piogranulomatosa composta por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos em 18,2% (2/11) dos animais. Conclui-se que as formas amastigotas de *L. infantum* foram demonstradas através da técnica da imuno-histoquímica na pele íntegra e ulcerada de cães parasitologicamente positivos e que os padrões histopatológicos da pele ulcerada revelaram principalmente dermatite mista caracterizada pela infiltração granulomatosa celular, enquanto que na pele íntegra observou-se dermatite liquenóide pelo mesmo infiltrado inflamatório.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, dermatopatia, diagnóstico, clínica de pequenos animais

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis is a systemic disease caused by *Leishmania infantum*. Dog usually present a variable clinical signs include anorexia, weight loss, generalized lymphadenopathy, but the skin lesion are the most found. The goal of this study was to evaluate the histopathological changes and detect amastigotes forms by immunohistochemistry in skin from dogs with natural infection by *L. infantum*. Fragments of ulcerated and normal skin from 22 positive dogs were collected, fixed in formalin and processed for histopathology and immunohistochemistry. Two groups of animals were used: the first was composed by 12 dogs with positive ELISA test and bone marrow biopsy (Group 1) and the second composed by 10 dogs positive only by ELISA test (Group 2). The results of immunohistochemistry showed amastigotes forms in 91,67% (11/12) of animals from Group 1, while none (0/10) of dogs in Group 2 was positive in the same technique. Regarding the histopathological pattern of intact skin, were observed nodular, perifollicular, diffuse and interface dermatitis in 9,1% (1/11) each one, lichenoid dermatitis in 27,3% (3/11), periadnexial dermatitis in 18,2% (2/11) and mixed dermatitis (nodular and perifollicular) were observed in 9,1% (1/11) of the dogs. Histological evaluation showed granulomatous cellular infiltration composed of macrophages, lymphocytes, plasma cells in 90,9% (10/11), while 9,1% (1/11) of health skin did not show changes. On the other hand, the histopathological pattern of ulcerative skin revealed perifollicular and periadnexial dermatitis in 9,1% (1/11) each one; lichenoid dermatitis in 18,2% (2/11), diffuse dermatitis in 27,3% (3/11) and 36,4% (4/11) of mixed dermatitis (interface and deep perivascular; interstitial and periadnexial; interface and periadnexial; interstitial, superficial perivascular and periadnexial). Histological evaluation of ulcerative skin showed granulomatous cellular infiltration composed of macrophages, lymphocytes, plasma cells in 81,8% (9/11) and piogranulomatous cellular infiltration composed of macrophages, lymphocytes, plasma cells and neutrophils in 18,2% (2/11) of animals. In conclusion, amastigotes forms of *L. infantum* were demonstrated using the technique of immunohistochemistry in ulcerated and intact skin of dogs parasitologically positive and the histological patterns of ulcerated skin revealed mainly mixed dermatitis characterized by granulomatous cellular infiltration, while the intact skin demonstrated lichenoid dermatitis by the same inflammatory infiltrate.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, skin disease, diagnosis, small animal clinical

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	11
2. Revisão bibliográfica	13
2.1. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral	13
2.2. Leishmaniose Visceral Canina	14
2.3. Dermatopatias na leishmaniose visceral canina	15
2.4. Sinais clínicos cutâneos na infecção por <i>L infantum</i> em cães	16
2.5. Diagnóstico da infecção por <i>L infantum</i> na pele de cães	17
3. Referências	18
4. Objetivos	23
4.1. Objetivo geral	23
4.2. Objetivos específicos	23
CAPÍTULO I - Avaliação do parasitismo da pele de cães com infecção natural por <i>Leishmania infantum</i> através da técnica de imuno-histoquímica	24
RESUMO	25
ABSTRACT	25
1. Introdução	26
2. Material e métodos	27
2.1. Animais	27
2.2. Imuno-histoquímica	27
3. Resultados e discussão	28
4. Refências	30
CAPÍTULO II - Avaliação histopatológica da pele íntegra e de lesões cutâneas ulcerativas de cães com infecção natural por <i>Leishmania infantum</i>	33
RESUMO	34
ABSTRACT	35
1. Introdução	35
2. Material e métodos	36

3. Resultados e discussão	37
4. Referências	40
5. Conclusões gerais	43

1. Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) tem sido reconhecida como um grande problema de saúde pública (COSTA et al., 2008; OTRANTO et al., 2009) particularmente quando considerada como antroponose ou antropozoonose, no qual o homem atua como reservatório no ciclo de transmissão do parasito (MONTEIRO et al., 2005).

A doença, causada pela *Leishmania infantum*, acomete uma variedade de animais domésticos e selvagens e o homem em áreas endêmicas da bacia Mediterrânea, Ásia e América (KUHLS et al., 2008; CARRILO e MORENO, 2009), sendo transmitida para os hospedeiros susceptíveis por insetos hematófagos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, por ocasião do repasto sanguíneo (NOLI, 1999).

No novo mundo, os canídeos domésticos são apontados como os mais importantes reservatórios urbanos da infecção (CIARAMELLA et al., 1997; DANTAS-TORRES, 2007; VERÇOSA et al., 2008), particularmente os animais assintomáticos (COSTA et al., 2008). Nestas condições, as taxas de prevalência da doença da infecção canina podem variar de 1,9 a 35 % (FRANÇA-SILVA et al., 2003), com tendência a crescimento (CALABRESE et al., 2010), representando, desta forma, importante função no ciclo de transmissão do parasito ao homem (CARRILO e MORENO, 2009; QUEIROZ et al., 2010).

A leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem sido considerada uma infecção crônica e muitas vezes fatal com sintomatologia variada (MICHALICK e GENARO, 2005), caracterizada por emagrecimento progressivo (KOUTINAS et al., 1992), onicogribose (CIARAMELLA et al., 1997), oftalmopatias (BRITO, 2004), hepatoesplenomegalia (SCOTT et al., 2001), além dos sinais inespecíficos como febre e anemia (BLAVIER et al., 2001; SCOTT et al., 2001).

No entanto, as lesões cutâneas são as manifestações clínicas mais comuns em cães com infecção por *L. infantum*, podendo-se observar diferentes formas e aspectos de lesões, devido a complexas interações parasito-hospedeiro envolvidas e à variação na resposta imune de cada animal (GENARO, 1993). Tanto a pele lesionada quanto aquela aparentemente sadia, provenientes de animais infectados, tem sido apontada como o reservatório tecidual de formas amastigotas de *L. infantum* (CIARAMELLA et al., 1997; SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações histopatológicas e detectar formas amastigotas através da imuno-histoquímica na pele de cães com infecção natural por *L. infantum*.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença parasitária que acomete o homem e diferentes espécies de mamíferos selvagens e domésticos dos países tropicais e subtropicais, sendo considerada de grande importância pela Organização Mundial de Saúde (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994).

A doença tem como agente causal nas Américas um protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (MAURICIO et al., 2000), que se encontra inserido no complexo *Leishmania donovani* (ASHFORD, 2000; FEITOSA et al., 2000). É transmitido para os hospedeiros susceptíveis por insetos hematófagos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON e RANGEL, 2005), por ocasião do repasto sanguíneo (NOLI, 1999).

No Brasil, atualmente, a LV é considerada endêmica em 80,77% do território nacional, destacando-se aqueles estados da região Nordeste, responsáveis por 40,38% dos casos anuais do país (GONTIJO e MELO, 2004; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; AGUIAR et al., 2007), sendo que a doença tem se tornado cada vez mais comum em áreas urbanas ou periurbanas (COSTA et al., 2008).

Fatores epidemiológicos como aqueles relacionados com as alterações do espaço geográfico como desmatamento e o crescimento desordenado das cidades (COSTA et al., 2008), aliada às ações antrópicas têm sido apontados como fatores preponderantes na ocorrência da LV no Brasil, favorecendo a migração de vetores e animais sinantrópicos infectados para o peri e intradomicílio (LAINSON e RANGEL, 2005).

Sendo assim, várias espécies de mamíferos têm sido encontradas naturalmente infectadas por *L. infantum*, particularmente os canídeos selvagens e marsupiais, que tem uma grande importância na interface dos ciclos silvestres e urbanos da LV no Brasil (LAINSON e RANGEL, 2005).

No ambiente urbano, os cães domésticos têm sido considerados os principais reservatórios da *L. infantum* (DANTAS-TORRES, 2007), representando importante função no ciclo de transmissão do parasito ao homem (CARRILO e MORENO, 2009; QUEIROZ et al., 2010). Sua importância está relacionada à frequência e abundância do parasitismo cutâneo, bem como, a altas taxas de prevalência (FRANÇA-SILVA et al., 2003) da infecção na população canina (SLAPPENDEL, 1998; THOMÉ, 1999; FEITOSA et al., 2000; RIBEIRO e MICHALICK, 2001).

2.2. Leishmaniose Visceral Canina

A infecção canina por *L. infantum* causa uma doença sistêmica crônica que está presente na Europa, Ásia, Norte da África e América do Sul (TRAVI et al., 1998).

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção canina é mais importante que a infecção no homem, pois a precede, além de ser mais prevalente e apresentar grande contingente de animais assintomáticos que albergam parasitos na derme (BONATES, 2003).

Clinicamente, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem sido considerada como uma enfermidade imuno-mediada (SLAPPENDEL e FERRER, 1998; STRAUSS e BANETH, 2000; FERRER, 2002). Sendo assim, na infecção por *Leishmania* sp., as células do sistema fagocítico mononuclear infectadas atuam como células apresentadoras de antígenos, estimulando os linfócitos T (SLAPPENDEL e FERRER, 1998; NOLI, 1999).

Após a infecção, os protozoários parasitam e replicam-se nos macrófagos da pele, podendo ser disseminados por via linfática ou sanguínea, infectando macrófagos da medula óssea, linfonodos, fígado e baço, assim como rins e trato intestinal de cães (LAGE et al., 2007).

Neste sentido, uma variedade de estímulos pode induzir mudanças funcionais, morfológicas e bioquímicas nos macrófagos ativados que produzem citocinas como TNF- α , IL-6, IL-18, IL-12 e IFN- γ , que são adjuvantes efetivos e pré-requisitos para a resposta dos linfócitos auxiliar (helper) 1 (Th1) nas infecções (AWASTHI et al., 2004).

Contudo, a imunidade à infecção em cães dá-se através de populações de linfócitos T que induzem a produção de citocinas para eliminar estes parasitas intracelulares (PINELLI et al., 1995), assim como de linfócitos B, com a produção de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2 (GENARO, 1993). São observadas, neste sentido, diferentes formas clínicas em função das complexas interações parasito-hospedeiro e à variação na resposta imune de cada animal (GENARO, 1993).

Na imunopatogênese da infecção, os linfócitos Th1 caracterizam-se pelo mecanismo de resistência frente à infecção (PINELLI et al., 1995), ativando os macrófagos que produzem óxido nítrico (NO). Este, por sua vez, exerce papel fundamental na imunidade celular por promoverem a apoptose das células parasitadas (HOLZMULLER et al., 2006).

Em contrapartida, os linfócitos T helper 2 (Th2) são considerados os principais responsáveis pela susceptibilidade do hospedeiro e desenvolvimento da doença (PINELLI et al., 1995).

Engwerda et al. (2004) propuseram que a patogênese e o desenvolvimento das lesões na LVC estavam diretamente relacionados à presença das formas amastigotas de *L. infantum* nos focos inflamatórios, uma vez que os macrófagos liberam o Fator de Necrose Tumoral (TNF) frente ao parasitismo.

Por outro lado, muitos aspectos da patogênese da LVC são atribuídos à produção exagerada de anticorpos, os quais formam imunocomplexos que se depositam em diversos tecidos, gerando lesões inflamatórias (SILVA, 2007).

Vale salientar que o desenvolvimento de imunidade celular está relacionado com a imunocompetência do hospedeiro, enquanto que o aparecimento dos sinais clínicos está associado com a imunidade humoral apresentando altos níveis de anticorpos (PINELLI et al., 1995).

Apesar da natureza viscerotrópica do protozoário, as lesões dermatológicas são as mais frequentes (FERRER et al., 1988; SLAPPENDEL e FERRER, 1998; SOLANO-GALLEGO et al., 2004), podendo representar o único sinal clínico da doença e acometer aproximadamente 90% dos cães com envolvimento visceral (KOUTINAS et al., 1992).

2.3. Dermatopatias na Leishmaniose Visceral Canina

Segundo Silva (2007), a pele é um órgão importante na determinação do progresso da infecção por *L. infantum*, apresentando uma correlação direta entre a quantificação das células de Langerhans, queratinócitos, macrófagos, células T e de formas amastigotas com diferentes aspectos dermatológicos em animais com sinais clínicos de LV (FONDEVILA et al., 1997).

Os sinais clínicos cutâneos de cães infectados com *L. infantum* podem apresentar-se de formas distintas, particularmente as dermatopatias. No entanto, Ferrer et al. (1988) propuseram quatro padrões dermatológicos diferentes na LVC, sendo o alopecico-descamativo e o ulcerativo os mais comuns, e o nodular e o pustular-estéril, os menos encontrados.

Neste sentido, foram reportados dois padrões de resposta inflamatória na pele de cães com LV, observando-se a presença de células de Langerhans, queratinócitos, MHC II+, infiltrado de células T e formas amastigotas do parasito em

cães com dermatite alopecica e, um segundo, onde foi detectada ausência de células apresentadoras de antígenos com pouca quantidade de parasitas e de macrófagos nos cães com lesões nodulares (SILVA, 2007).

Contudo, apesar das dermatopatias serem comuns na LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2004), a maioria dos cães infectados não apresenta sinais clínicos e mesmo na pele sadia pode haver a presença de formas amastigotas de *L. infantum* (ABRANCHES et al., 1998; MADEIRA et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2004; MADEIRA et al., 2009; QUEIROZ et al., 2011).

Portanto, os cães assintomáticos são muito importantes na epidemiologia da doença por não se demonstrarem suspeitos, além de servirem como fonte de infecção ao inseto vetor (MADEIRA et al., 2004; MADEIRA et al., 2009; QUEIROZ et al., 2011).

2.4. Sinais clínicos cutâneos na infecção por *L. infantum* em cães

A dermatite esfoliativa com formação de caspas branco-acinzentadas é um achado comum na LV em cães. A esfoliação pode ser generalizada, mas geralmente é mais pronunciada na cabeça, orelhas e extremidades. A hiperqueratose nasodigital pode acompanhar a formação de caspas e a pele envolvida pode ficar de hipotricótica à alopecica (SCOTT et al., 2001).

Por outro lado, as ulcerações podem ser circunscritas, anulares ou policíclicas, com bordas elevadas e fundo granuloso de cor vermelho-vivo, recobertas ou não por exsudato seroso e serossanguinolento. As úlceras podem estar dispostas na narina, lábio, face, periocular, orelhas e sobre as áreas de projeções ósseas, principalmente nas regiões úmero-radio-ulnar, calcâneo e tuberosidade isquiática (TORRES-NETO et al., 2008).

É importante ressaltar também que, como um anexo cutâneo, as unhas podem sofrer alteração em sua matriz, causando a onicogribose que é um sinal clínico bastante encontrado na LV na espécie canina, podendo acometer 24-90% dos animais sintomáticos (CIARAMELLA et al., 1997; VERÇOSA et al., 2008).

Outros achados dermatológicos incluem despigmentação nasal, paroníquia, dermatite pustular estéril e dermatite nodular (SCOTT et al., 2001). Os nódulos comumente apresentam-se de forma difusa podendo ter poucos milímetros ou até 10 cm de diâmetro e as pústulas, em geral, concentram-se em regiões de pele delgada como o abdômen ventral, virilha e axilas (FERRER et al., 1988).

A dermatite papular também foi descrita como outro padrão dermatológico relacionado à infecção por *L. infantum* (ORDEIX et al., 2005).

2.5. Diagnóstico da infecção por *L. infantum* na pele de cães

Não obstante, o tecido cutâneo pode sofrer grandes modificações estruturais mediadas pela infecção por *L. infantum*. O processo inflamatório plasmohistiolinfocitário, com graus variados de intensidade, pode ser observado ao redor dos anexos ou difusamente na derme (SOLANO-GALLEGO et al., 2004). Contudo, o exame histopatológico da pele corado pela Hematoxilina-Eosina (HE) é pouco sensível para detecção das formas amastigotas quando comparado a outros métodos diagnósticos (FERRER et al., 1988; QUEIROZ et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011).

A utilização da técnica da Imuno-Histoquímica (IHQ) tem demonstrado eficiência para identificação do parasitismo tecidual e vem sendo utilizada como método diagnóstico na LVC (FERRER et al., 1988; TAFURI et al., 2004; COSTA et al., 2008; MOURA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; TOPLU e AYDOGAN, 2011).

Esta técnica é mais sensível do que a HE (MOREIRA et al., 2007), sendo possível detectar até mesmo um pequeno número de formas amastigotas no tecido cutâneo parasitado (ORDEIX et al., 2005), aumentando o valor preditivo do teste quando esta técnica é associada à sorologia (QUEIROZ et al. 2010) e a testes moleculares (XAVIER et al., 2006; QUEIROZ et al., 2010).

3. Referências

- ABRANCHES, P. et al. Leishmaniose canina: novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controle da leishmaniose visceral humana. **Acta Médica Portuguesa**, v. 11, p. 871-875, 1998.
- AGUIAR, P.H.P. et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p.283-294, 2007.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal Parasitology**, v. 30, p. 1269–128, 2000.
- AWASTHI, A. et al. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, p. 238-258, 2004.
- BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.
- BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Veterinary News**, n. 61, p. 4-5, 2003.
- BRITO, F.L.C. **Alterações oculares e análise do humor aquoso em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* (Cunha e Chagas, 1937)**. 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- CALABRESE, K.S. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 253–257, 2010.
- CARRILO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 128, p. 67-70, 2009.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p.539-543, 1997.
- COSTA, M.M.S. et al. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 613-616, 2008.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139–146, 2007.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

ENGWERDA, C.R. et al. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n.11, p.524-530, 2004.

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

FERRER, L et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: PROCEEDINGS OF SECOND INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM. Sevilla, Spain. **Canine Leishmaniasis: moving towards a solution**. Salamanca: Intervet Internacional bv, p. 21-24, 2002.

FONDEVILA, D. et al. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 56, p. 319-327, 1997.

FRANÇA-SILVA, J.C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.111, p.161-173, 2003.

GENARO, O. **Leishmaniose Visceral canina experimental**. 1993. 202f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

HOLZMULLER, P. et al. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, v. 132, p. 19-32, 2006.

KOUTINAS, A.F. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): A clinical and histopathologic study on 22 spontaneous cases in Greece. **Veterinary Dermatology**, v. 3, n. 3, p. 121-130, 1992.

KUHLS, K. et al. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. **Public Library of Science Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, p. 261, 2008.

LAGE, R.S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.115, p.135-145, 2007.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brasil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n.8, p. 811-827, 2005.

MADEIRA, M.F. et al. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 440-444, 2004.

MADEIRA, M.F. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 260-262, 2009.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil—Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The stranger case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v.16, p.188-189, 2000.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, p. 56-72, 2005.

MONTEIRO, E.M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.38, n.2, p.147-152, 2005.

MOREIRA, M.A.B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007.

MOURA, E.P. et al. Histopathological and parasitological analysis of skin tissues biopsies from two distinct anatomical areas of the ears of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, n. 1, p. 10-15, 2008.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

ORDEIX, L. et al. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 187–191, 2005.

OTRANTO, D. et al. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 157-163, 2009.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, p. 1594–1600, 1995.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 34-40, 2010.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin, **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 1-8, 2011.

RIBEIRO, V.M.; MICHALICK, M.S.M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. **Revista Nosso Clínico**, n. 24, p. 10-20, 2001.

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

SILVA, F.S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Tropical – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 31, 2007.

SLAPPENDEL, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v.10, n.1, p.1-16, 1998.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**, Philadelphia: W.B. Saunders, p. 450-458, 1998.

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

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis. In: Recent Advances in Canine Infections Diseases. **International Veterinary Information Service**, 2000.

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

THOMÉ, S. M. G. Cuidados com as leishmanioses. **Revista Cães e Gatos**, n. 85, p. 46-50, 1999.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, Apr 9, 2011.

TORRES-NETO, R. et al. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 667-676, 2008

TRAVI, B.L. et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 88, p. 73-75. 1998.

VERÇOSA, B.L.A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 4, n. 45, 2008.

XAVIER, S.C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 2, n. 17, 2006.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

- Analisar o parasitismo cutâneo através da técnica da imuno-histoquímica e avaliar as alterações histopatológicas da pele de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar o parasitismo cutâneo de cães com infecção natural por *L. infantum* através da técnica da imuno-histoquímica;
- Avaliar as alterações histopatológicas da pele de cães com infecção natural por *L. infantum*;
- Avaliar a localização das úlceras cutâneas de cães com infecção natural por *L. infantum*.

CAPÍTULO I

**Avaliação do parasitismo da pele de cães com infecção natural por
Leishmania infantum através da técnica de imuno-histoquímica**

Avaliação do parasitismo da pele de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* através da técnica de imuno-histoquímica

*Evaluation of skin parasitism of dogs with natural infection by *Leishmania infantum* by using the immunohistochemical technique*

SANTOS, E.M.S.^{1*}; OLIVEIRA, V.V.G.¹; SEVERO, S.M.²; PIMENTEL, D.S.¹;
FAUSTINO, M.A.G.¹; AVES, L.C.¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil. CEP 52171-900. *Autor para correspondência: ednamichelly@hotmail.com

²Universidade Federal de Sergipe - UFS, Av. Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, Cidade Universitária Professor José Aloísio de Campos, São Cristóvão-SE. CEP 49100-000.

RESUMO

A leishmaniose visceral em cães é considerada uma doença imunomediada, embora uma parcela relativamente pequena de cães demonstre sinais clínicos. Porém, o envolvimento cutâneo ocorre em quase todos os animais infectados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o parasitismo da pele íntegra e de úlceras cutâneas de cães com infecção natural por *L. infantum* através da técnica da imuno-histoquímica. Fragmentos de pele íntegra e de lesões ulcerativas foram coletados de 22 cães, fixados em formalina e processados para a imuno-histoquímica. Dois grupos de animais foram utilizados: o primeiro foi composto por 12 cães com teste ELISA e biópsia de medula óssea positivos (Grupo 1) e o segundo composto por 10 cães positivos apenas no teste ELISA (Grupo 2). Os resultados mostraram imunomarcagem de formas amastigotas em 91,67% (11/12) dos animais do Grupo 1 enquanto nenhum (0/10) dos cães do Grupo 2 foi positivo na mesma técnica. De acordo com esses resultados, concluímos que a imuno-histoquímica é uma técnica simples e sensível para a detecção de *L. infantum* na pele íntegra ou ulcerada de cães naturalmente infectados diagnosticados através do parasitológico de medula óssea.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, dermatopatia, técnica de diagnóstico.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis in dogs is considered the immune-mediated disease, although a relatively small proportion of dogs showing clinical signs. However, the cutaneous involvement occurs in almost all the infected animals. The goal of this study was to evaluate the parasitism of intact skin and skin ulcers in dogs with natural infection by *L. infantum* by using the of immunohistochemistry technique. Fragments of ulcerated and normal skin were collected from 22 positive dogs, fixed in formalin and processed for immunohistochemistry. Two groups of animals were used: the first was composed by 12 dogs with positive ELISA test and bone marrow

biopsy (Group 1) and the second composed by 10 dogs only positive in the ELISA test (Group 2). The results showed immune-marcation of amastigotes forms in 91,67% (11/12) of animals from Group I while none (0/10) of dogs in group II was positive in the same technique. According to these results, we conclude that immunohistochemistry is a simple and sensitive technique to detect of *L. infantum* in the intact or ulcerated skin of naturally infected dogs diagnosis by parasitological of bone marrow.

Key-words: Canine visceral leishmaniasis, skin diseases, diagnostic technique.

1. Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma importante zoonose que acomete o homem e o cão (SLAPPENDEL e FERRER, 1998), estando em situação de endemicidade em 80,77% dos estados brasileiros (QUEIROZ et al., 2011).

Sendo assim, os canídeos domésticos são apontados como os mais importantes reservatórios urbanos da infecção (CIARAMELLA et al., 1997; DANTAS-TORRES, 2007; VERÇOSA et al., 2008), podendo apresentarem-se assintomáticos (BLAVIER et al., 2001) ou exibirem uma variedade de sinais clínicos representados por dermatopatias, emagrecimento progressivo (BONATES, 2003), onicogribose (FEITOSA et al., 2000), oftalmopatias (BRITO, 2004), hepatoesplenomegalia, linfadenopatia (NOLI, 1999), entre outros.

Contudo, as dermatopatias nos cães são as manifestações clínicas mais comuns da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (CIARAMELLA et al., 1997), apresentando-se como diversos graus de dermatite esfoliativa, ulcerativa, nodular e pustular, associadas ou não (FERRER et al., 1988; COSTA et al., 2008). Podem ainda ser encontradas com outros sinais clínicos e/ou anormalidades clínico-patológicas (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Além disso, a pele é um órgão importante na interação entre o parasito e o sistema imune do cão (CIARAMELLA et al., 1997), bem como na determinação do progresso da infecção por *L. infantum*. Apresenta também uma correlação direta entre a quantificação das células de Langerhans, queratinócitos, macrófagos, células T e de formas amastigotas com diferentes aspectos dermatológicos em animais com sinais clínicos de leishmaniose visceral (FONDEVILA et al., 1997).

Apesar de a pele apresentar uma quantidade significativa de parasitos, o exame histopatológico deste tecido corado pela Hematoxilina-Eosina (HE) é pouco sensível para detecção das formas amastigotas de *L. infantum* (QUEIROZ et al.,

2011). Exames mais específicos como a técnica de Imuno-Histoquímica (IHQ) possuem o valor de diagnóstico definitivo da infecção (TAFURI et al., 2004).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o parasitismo tecidual da pele íntegra e de úlceras cutâneas de cães com infecção natural por *Leishmania infantum* através da técnica de imuno-histoquímica.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Foram utilizados fragmentos de pele íntegra e de úlceras cutâneas de 22 cães, sendo 13 machos e nove fêmeas de raças e idades variadas procedentes de diferentes municípios do estado de Pernambuco.

Para execução do experimento, todos os procedimentos invasivos foram realizados mediante aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, segundo licença 010/2011.

Os animais utilizados no presente estudo foram eutanasiados por médicos veterinários em Centros de Controle de Zoonoses do estado de Pernambuco de acordo com a resolução 714/2002, como parte do programa de controle da LV em função da positividade nos testes de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e/ou exame parasitológico.

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo I, sendo 12 caninos parasitologicamente positivos em esfregaços de medula óssea e sorologicamente positivos no exame de ELISA e grupo II, 10 animais parasitologicamente negativos em esfregaços de medula óssea e sorologicamente positivos no exame de ELISA.

Antes da coleta de fragmentos de pele, todos os animais foram submetidos ao exame clínico-dermatológico, segundo Scott et al. (2001), para avaliar a localização e extensão das lesões cutâneas que apresentavam.

2.2. Imuno-histoquímica

Fragmentos cilíndricos (*punch* 4 mm) foram coletados e fixados em formalina tamponada 10%. Após 24h de fixação, as amostras foram desidratadas, clarificadas, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo com espessura de 5µm.

A imuno-histoquímica pela estreptoavidina-peroxidase foi realizada para a detecção de formas amastigotas no tecido cutâneo através da microscopia óptica segundo técnica descrita por Tafuri et al. (2004). Os cortes foram desparafinizados,

hidratados e incubados em peróxido de hidrogênio 4% (30V) em PBS 0,01 M de pH 7,2, seguido pela incubação em leite desnatado para bloqueio das ligações inespecíficas. Soro hiperimune (Reação de Imunofluorescência Indireta 1:640) de um cão naturalmente infectado foi utilizado como anticorpo primário (diluição 1:100) e as amostras foram incubadas em câmara úmida por 18h a 4°C. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpos biotinilados de cabra anti-coelho e anti-camundongo (DAKO, Kit-LSAB 2, Califórnia, EUA). Depois, os cortes foram incubados com estreptoavidina-peroxidase (DAKO LSAB 2, Califórnia, EUA) por 20 minutos em temperatura ambiente, seguido pela reação realizada com diaminobenzidina (DAB, DAKO, Kit-LSAB 2, Califórnia, EUA). Finalmente, os cortes foram desidratados, clarificados e contra-corados com hematoxilina de Harris para posterior montagem com lamínula.

3. Resultados e discussão

A técnica de imuno-histoquímica revelou que 91,67% (11/12) (Figura 1a) dos animais do grupo I apresentaram-se positivos para formas amastigotas de *L. infantum* enquanto nenhum dos dez cães do grupo II (Figura 1b) apresentou reação ao teste.

Os resultados aqui encontrados foram concordantes com Figueiredo (2009) que observou a alta sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica, a partir da utilização da estreptoavidina peroxidase, em animais com diagnóstico parasitológico de LV, assim como com Ferrer et al. (1991) e Tafuri et al. (2004), os quais relataram que a técnica de imuno-histoquímica possui o valor de diagnóstico definitivo da infecção, além de ser um método simples e de baixo custo, conforme afirmaram Xavier et al. (2006).

Os resultados encontrados no grupo I foram superiores aqueles relatados por Xavier et al. (2006) que utilizaram fragmentos cutâneos de várias regiões anatômicas de cães com infecção natural por *L. infantum*, observando 62,1% de positividade com a IHQ.

Com relação ao Grupo II, onde não foi observado imunomarcagem, deve-se considerar que os exames sorológicos são considerados rápidos e práticos, mas com sensibilidade variável e especificidade baixa para o diagnóstico da LV em cães (INIESTA et al., 2002). Apesar do programa de controle da LV no Brasil indicar a eutanásia de cães com diagnóstico sorológico positivo, particularmente a Reação de

imunofluorescência Indireta (RIFI) e Imunoadsorção Enzimática (ELISA), estas provas apresentam limitações no que se refere à especificidade dos testes (ANDRADE, 2008).

Sendo assim, os animais com diagnóstico sorológico positivo, aqui encontrados, através do teste ELISA, podem fazer parte daqueles considerados falso-positivos (INIESTA et al., 2002). Portanto, como proposto por Oliveira (2009), deve-se fazer uso associado em paralelo da RIFI e do ELISA em cães de áreas endêmicas no programa de controle da LV.

Por outro lado, deve-se considerar que os animais utilizados neste estudo foram provenientes de infecção natural, com evolução e estágio clínico da doença variável.

De acordo com os achados, é possível concluir que a imuno-histoquímica da pele íntegra ou ulcerada de cães com leishmaniose visceral é uma técnica simples e sensível para a detecção de *L. infantum* na pele íntegra ou ulcerada de cães naturalmente infectados diagnosticados através do parasitológico de medula óssea.

4. Referências

ANDRADE, R.A. **Inovações metodológicas para o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde).

BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.

BONATES, A. Leishmaniose visceral (calazar). **Veterinary News**, n. 61, p. 4-5, 2003.

BRITO, F.L.C. **Alterações oculares e análise do humor aquoso em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* (Cunha e Chagas, 1937)**. 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p.539-543, 1997.

COSTA, M.M.S. et al. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 613-616, 2008.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139–146, 2007.

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

FERRER, L et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988.

FERRER, L. et al. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. **Veterinary Pathology**, v. 28, p. 342-343, 1991.

FIGUEIREDO, M.M. **Análise histológica, parasitológica e morfométrica da pele de orelha sã de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2009, 101f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FONDEVILA, D. et al. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 56, p. 319-327, 1997.

INIESTA, L. et al. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, 2002.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

OLIVEIRA, F.L.L. **Avaliação dos métodos sorológicos de rotina no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2009, 29f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Teresina.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin, **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 1-8, 2011.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**, Philadelphia: W.B. Saunders, p. 450-458, 1998.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1–18, 2009.

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

VERÇOSA, B.L.A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 4, n. 45, 2008.

XAVIER, S.C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 2, n. 17, 2006.

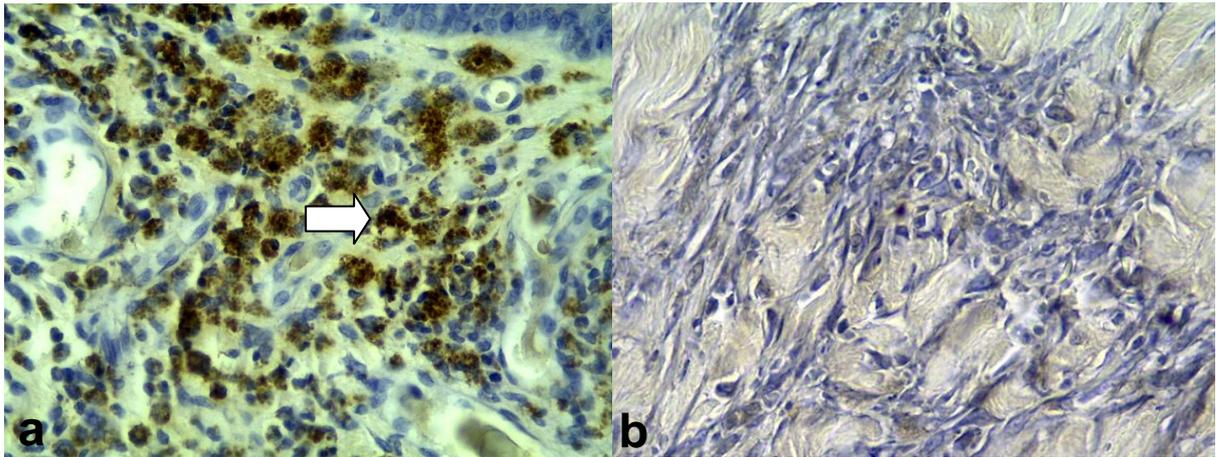


Figura 1. Fotomicrografias.

a. Derme de úlcera cutânea de um cão do grupo I submetido à técnica da imunohistoquímica pela estreptoavidina-peroxidase. Macrófago repleto de formas amastigotas de *Leishmania infantum* reveladas pela IHQ. Seta. 40X.

b. Derme de úlcera cutânea de um cão do grupo II submetido à técnica da IHQ pela estreptoavidina-peroxidase. Não houve imuno-marcação de formas amastigotas. 40X.

CAPÍTULO II

Avaliação histopatológica da pele íntegra e de lesões cutâneas ulcerativas de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*

Avaliação histopatológica da pele íntegra e de lesões cutâneas ulcerativas de cães com infecção natural por *Leishmania infantum*

*Histopathological evaluation of intact and ulcerative skin lesions of dogs with natural infection by *Leishmania infantum**

SANTOS, E.M.S.^{1*}; OLIVEIRA, V.V.G.¹; FAUSTINO, M.A.G.¹; AVES, L.C.¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil. CEP 52171-900. *Autor para correspondência: ednamichelly@hotmail.com

RESUMO

A leishmaniose visceral em cães é considerada uma doença imunomediada, embora uma parcela relativamente pequena de cães demonstre sinais clínicos. Porém, o envolvimento cutâneo ocorre em quase todos os animais infectados. O objetivo deste trabalho foi avaliar os padrões histopatológicos da pele íntegra e de úlceras cutâneas de cães com infecção natural por *L. infantum*. Fragmentos de pele íntegra e de úlceras cutâneas de 11 cães com teste ELISA, imuno-histoquímica e biópsia de medula óssea positivos foram coletados, fixados em formalina e processados para histopatologia. A histopatologia dos fragmentos de pele íntegra demonstrou infiltrado inflamatório granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos em 90,9% (10/11), enquanto 9,1% (1/11) não apresentaram alterações histopatológicas. Com relação aos padrões histopatológicos, encontramos 9,1% (1/11) de dermatite nodular, perifolicular, difusa e da interface, cada uma, bem como dermatite liquenóide em 27,3% (3/11), dermatite perianexial em 18,2% (2/11) e dermatite mista (nodular e perifolicular) foi observada em 9,1% (1/11) dos cães. Por outro lado, os fragmentos de úlceras cutâneas demonstraram infiltrado granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos em 81,8% (9/11) das amostras, enquanto 18,2% (2/11) apresentaram infiltrado celular piogranulomatoso composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Os padrões histopatológicos da pele ulcerada revelaram dermatite perifolicular e perianexial em 9,1% (1/11), cada uma; dermatite liquenóide em 18,2% (2/11), dermatite difusa em 27,3% (3/11) e 36,4% (4/11) de dermatite mista (interface e perivascular profunda; intersticial e perianexial; interface e perianexial; intersticial, perivascular superficial e periadnexial). Com base neste dados, pode-se concluir que os padrões histopatológicos da pele ulcerada revelaram principalmente dermatite mista caracterizada pela infiltração celular granulomatosa, enquanto a pele íntegra demonstrou dermatite liquenóide pelo mesmo infiltrado inflamatório.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, dermatopatia, diagnóstico.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis in dogs is considered the immune-mediated disease, although a relatively small proportion of dogs showing clinical signs. However, the cutaneous involvement occurs in almost all the infected animals. The goal of this study was to evaluate the histopathological patterns of intact and ulcerated skin in dogs with natural infection by *L. infantum*. Fragments of intact skin and ulcers skin of 11 dogs with ELISA, immunohistochemistry and bone marrow positive were collected, fixed in formalin and processed for histopathology. Histopathology of fragments of intact skin showed granulomatous cellular infiltration composed of macrophages, lymphocytes, plasma cells in 90,9% (10/11), while 9,1% (1/11) of health skin did not show changes. Regarding the histopathological pattern were observed nodular, perifollicular, diffuse and interface dermatitis in 9,1% (1/11) each one, lichenoid dermatitis in 27,3% (3/11), periadnexial dermatitis in 18,2% (2/11) and mixed dermatitis (nodular and perifollicular) were observed in 9,1% (1/11) of the dogs. On the other hand, ulcers skin fragments showed granulomatous cellular infiltration composed of macrophages, lymphocytes, plasma cells in 81,8% (9/11) of samples, while 18,2% (2/11) showed piogranulomatous cellular infiltration composed of macrophages, lymphocytes, plasma cells and neutrophils. The histopathological patterns of ulcerative skin revealed perifollicular and periadnexial dermatitis in 9,1% (1/11) each one, lichenoid dermatitis in 18,2% (2/11), diffuse dermatitis in 27,3% (3/11) and 36,4% (4/11) of mixed dermatitis (interface and deep perivascular; interstitial and periadnexial; interface and periadnexial; interstitial, superficial perivascular and periadnexial). Based on this data, we can conclude that the histopathological patterns of ulcerated skin revealed mainly mixed dermatitis characterized by granulomatous cell infiltration, while the intact skin showed lichenoid dermatitis by the same inflammatory infiltrate.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis, skin disease, diagnostic.

1. Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada endêmica em 21 estados do país, principalmente os da região Nordeste, responsável pela maior parte dos casos (GOTIJO e MELO, 2004). No estado de Pernambuco, a ocupação desordenada do espaço e a capacidade de domiciliação do inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* têm contribuído para expansão da doença (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006).

Uma vez infectado, as primeiras células de defesa do hospedeiro susceptível a reconhecerem os promastigotas como micro-organismos estranhos são as células dendríticas e macrófagos. Estas células são fundamentais para o processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T (BRANDONISIO et al., 2004).

A quantidade de células de Langerhans, queratinócitos, expressando MHC II+, macrófagos, células T e parasitas foram descritas estabelecendo relação com

diferentes aspectos dermatológicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (FONDEVILA et al., 1997).

Apesar de o tecido cutâneo sofrer grandes modificações estruturais mediadas pela infecção por *L. infantum*, particularmente um processo inflamatório plasmohistiolinfocitário, com graus variados de intensidade, pode ser observado em torno dos vasos e dos folículos pilosos (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; XAVIER et al., 2006a; QUEIROZ et al., 2011; TOPLU e AYDOGAN, 2011), estabelecendo três padrões histopatológicos mais comuns que são dermatite perivascular superficial e profunda, perifoliculite granulomatosa e a dermatite intersticial (SCOTT et al., 2001).

Em função do aumento de novos casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em Pernambuco associado à grande causuística das dermatopatias caninas na clínica de pequenos animais, objetivou-se avaliar as alterações histopatológicas da pele íntegra e de lesões cutâneas ulcerativas de cães com infecção natural por *L. infantum* através da técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

2. Material e métodos

Foram utilizados 11 cães, sendo quatro machos e sete fêmeas de raças e idades variadas procedentes de diferentes municípios do Estado de Pernambuco.

Para execução do experimento, todos os procedimentos invasivos foram realizados mediante aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco segundo licença 010/2011.

Todos os animais utilizados no presente estudo foram naturalmente infectados e apresentavam teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) positivo, bem como positividade no exame parasitológico de medula óssea e quadro clínico de dermatite ulcerativa. Os cães foram eutanasiados por médicos veterinários, segundo a resolução 714/2002, como parte do programa de controle da LV em Centros de Controle de Zoonoses do Estado de Pernambuco. Após a eutanásia, fragmentos cilíndricos (*punch* 4 mm) sendo um fragmento de pele íntegra da região escapular e um fragmento de pele ulcerada de cada um dos cães envolvidos no estudo foram coletados e fixados em formalina tamponada 10%. Após 24h de fixação, as amostras foram desidratadas, clarificadas, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo com espessura entre 5µm e, posteriormente, coradas com Hematoxilina-Eosina (HE).

Antes da coleta de fragmentos de pele, todos os animais foram submetidos ao exame clínico-dermatológico, segundo Scott et al. (2001), para avaliar a localização e extensão das lesões cutâneas.

Todas as amostras cutâneas analisadas tiveram confirmação do parasitismo pelas formas amastigotas de *L. infantum* através da técnica de imuno-histoquímica, segundo protocolo descrito por Tafuri et al. (2004).

3. Resultados e discussão

Todos os animais apresentavam lesões cutâneas ulcerativas em diferentes regiões da pele, sendo que 27,3% (3/11) apresentaram lesões ulcerativas sobre os cotovelos, 18,2% (2/11) na região dorso-torácica, 18,2% (2/11) nas pontas das orelhas, 9,1% (1/11) apresentaram úlceras no focinho, 9,1% (1/11) sobre o íleo, 9,1% (1/11) na região direita da face e 9,1% (1/11) sobre as falanges dos membros torácicos.

De acordo com os resultados encontrados, as projeções ósseas (cotovelos, íleo e falanges) foram às localizações onde mais se observaram as lesões ulcerativas dos animais analisados.

Muito embora Figueiredo (2009) tenha afirmado que as lesões na pele são achados clínicos frequentes em cães com LV, sendo sua extensão e localização variada, os resultados encontrados concordam com Ferrer et al. (1988) que relataram que a maioria dos cães com LV apresenta úlceras cutâneas sobre projeções ósseas, locais onde se observa alta carga parasitária, estando diretamente relacionada à intensidade do processo inflamatório (MOURA et al., 2008).

As úlceras cutâneas foram apontadas por Costa et al. (2008) como um dos sinais clínicos mais comuns, antecedido apenas pela onicogribose e estando presente em 45% dos cães estudados. Por outro lado, Scott et al. (2001) afirmaram que a lesão ulcerativa não é um achado cutâneo predominante quando comparado a dermatite esfoliativa apresentada por cães com LV.

Segundo Ridley e Ridley (1983), as lesões ulcerativas na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) ocorrem devido à liberação dos parasitos de macrófagos na derme causando uma intensa reação inflamatória. De acordo com Torres-Neto (2008), poderá haver a formação de uma vasculite que, associada à pressão nos pontos de apoio, poderá causar uma isquemia do tecido e a provável formação de

úlceras no local. Isso pode justificar a ocorrência de lesões ulcerativas nas projeções ósseas encontradas na maioria dos cães analisados neste estudo, concordando com Madeira et al. (2009) que afirmaram que a maior parte das lesões cutâneas dos animais com LVC por eles analisados, apresentava-se nas tuberosidades ósseas.

Ao exame histopatológico, os fragmentos de úlceras cutâneas demonstraram infiltrado granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos em 81,8% (9/11) das amostras (Figura 1a), enquanto 18,2% (2/11) apresentaram infiltrado piogranulomatoso composto por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos.

Os dados referentes à reação inflamatória granulomatosa com presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos aqui observada na maioria dos cães (81,8%), são concordantes com Costa et al. (2008) e Calabrese et al. (2010) que observaram o mesmo padrão inflamatório na pele lesionada de cães com LV. Entretanto, diferem dos resultados encontrados por Torres-Neto (2008) e Ferrer et al. (1988) que encontraram reação piogranulomatosa predominante e eosinófilos no processo inflamatório tecidual, respectivamente.

Quanto ao padrão histopatológico das lesões, foram encontrados 27,3% (3/11) de dermatite difusa, 9,1% (1/11) de dermatite perianexial, 18,2% (2/11) de dermatite liquenóide, 9,1% (1/11) de dermatite perifolicular, enquanto 36,4% (4/11) demonstraram padrões mistos como o de dermatite de interface e perivascular profunda, dermatite intersticial e perianexial, dermatite da interface e perianexial, além de dermatite intersticial, perivascular superficial e perianexial (Figura 1b).

Esses resultados concordam com Ferrer et al. (1988) e Scott et al. (2001), os quais afirmaram que é muito comum o cão apresentar mais de um padrão de inflamatório nas lesões produzidas por *L. infantum*. Segundo Scott et al. (2001), nove padrões inflamatórios podem ser identificados na leishmaniose, refletindo a variabilidade clínica da doença (KOUTINAS, 1992). Além disso, segundo Gross et al. (2005), a dermatite mista pode refletir a possibilidade de associação da LV com outras dermatopatias.

Os padrões histopatológicos encontrados nas úlceras cutâneas dos cães concordam com Queiroz et al. (2011) que observaram dermatite perifolicular e perivascular na pele de cães oligossintomáticos, bem como dermatite perivascular na derme daqueles polissintomáticos.

Apesar das lesões cutâneas serem comuns na LVC, pesquisas sobre o parasitismo da pele íntegra pela *L. infantum* demonstram a importância da pele mesmo sem lesão na epidemiologia da doença (TRAVI et al. 2001; SOLANO-GALLEGO et al. 2004).

A histopatologia dos fragmentos de pele íntegra da região da escápula demonstrou infiltrado inflamatório granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos em 90,9% (10/11) (Figura 1c), enquanto 9,1% (1/11) não apresentaram alterações histopatológicas.

Com relação aos padrões histopatológicos, foram encontrados 9,1% (1/11) de dermatite nodular, 9,1% (1/11) de dermatite perifolicular, 27,3% (3/11) de dermatite liquenóide (Figura 1d), 18,2% (2/11) de dermatite perianexial, 9,1% (1/11) de dermatite difusa, 9,1% (1/11) de dermatite de interface e 9,1% (1/11) que exibiram padrões mistos como a dermatite nodular e perifolicular.

Os resultados encontrados neste estudo concordam com Solano-Gallego et al. (2004) que observaram lesões microscópicas significativas na pele íntegra, com envolvimento dos folículos pilosos e as glândulas sebáceas.

Processo inflamatório granulomatoso com presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos também foi descrito por Xavier et al. (2006a) na pele de um cão assintomático, porém situado ao redor dos vasos, glândulas e profundamente na derme.

Segundo Xavier et al. (2006b), o processo inflamatório da pele de cães LV pode estar presente em diferentes localizações da pele, seja ela íntegra ou lesionada, porém a sua intensidade varia de acordo com os sinais clínicos apresentados pelo animal.

Com base nos resultados aqui observados, pode-se concluir que os padrões histopatológicos da pele ulcerada demonstraram principalmente dermatite mista caracterizada pela infiltração granulomatosa celular, enquanto a pele íntegra demonstrou dermatite liquenóide pelo mesmo infiltrado inflamatório.

4. Referências

BRANDONISIO, O. et al. Dendritic cells in *Leishmania* infection. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1402–1409, 2004.

CALABRESE, K.S. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 253-257, 2010.

COSTA, M.M.S. et al. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 613-616, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

FERRER, L et al. Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 381-388, 1988.

FIGUEIREDO, M.M. **Análise histológica, parasitológica e morfométrica da pele de orelha sã de cães naturalmente e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2009, 101f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FONDEVILA, et al. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 56, p. 319-327, 1997.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GROSS, T.L. et al. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. Oxford: Blackwell, 2005.

KOUTINAS, A.F. et al. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): A clinical and histopathologic study on 22 spontaneous cases in Greece. **Veterinary Dermatology**, v. 3, n. 3, p. 121-130, 1992.

MADEIRA, M.F. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 260-262, 2009.

MOURA, E.P. et al. Histopathological and parasitological analysis of skin tissues biopsies from two distinct anatomical areas of the ears of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, n. 1, p. 10-15, 2008.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin, **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 1-8, 2011.

RIDLEY, D.S.; RIDLEY, M. The evolution of lesions in cutaneous leishmaniasis. **Journal of Pathology**, v. 141, p. 83-96, 1983.

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

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

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

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, Apr 9, 2011.

TORRES-NETO, R. et al. Padrões histopatológicos das lesões descamativas e ulcerativas da pele em cães com leishmaniose. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 667-676, 2008.

TRAVI, B.L. et al. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **American Journal of the Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, p. 119-24, 2001.

XAVIER, S. C. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 994-1000, 2006a.

XAVIER, S.C. et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 2, n. 17, 2006b.

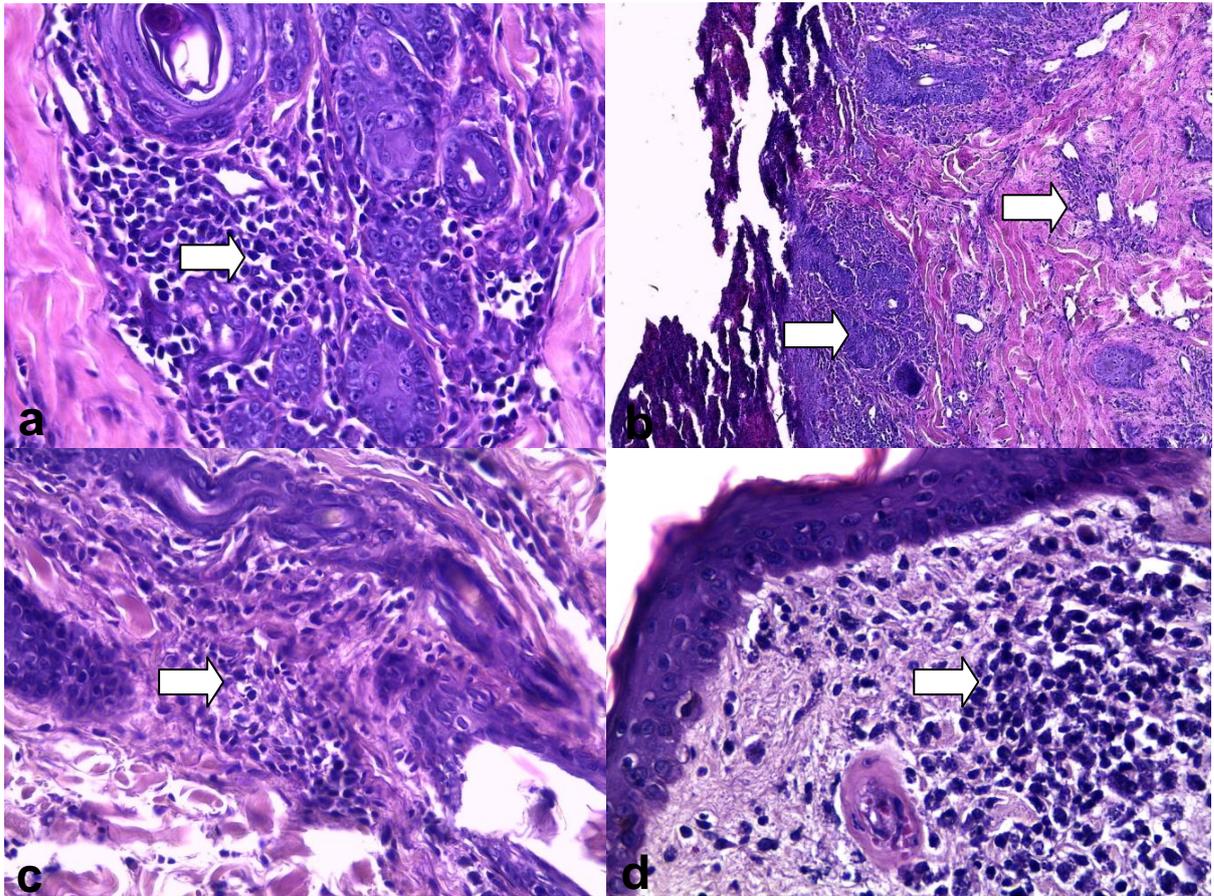


Figura 1. Fotomicrografias.

- a. Processo inflamatório granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos na pele ulcerada. Seta. HE. 40X.
- b. Dermatite mista na pele ulcerada (dermatite intersticial, perivascular superficial e perianexial). Setas. HE. 10X.
- c. Processo inflamatório granulomatoso composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos na pele íntegra. Seta. HE. 40X.
- d. Dermatite liquenóide na pele íntegra. Seta. HE. 40X.

5. Conclusões gerais

- A imuno-histoquímica da pele íntegra ou ulcerada de cães com leishmaniose visceral é uma técnica simples e sensível para a detecção de *L. infantum* na pele íntegra ou ulcerada de cães naturalmente infectados diagnosticados através do parasitológico de medula óssea;
- As áreas de projeções ósseas são as principais localizações para o desenvolvimento de lesões ulcerativas na pele de cães naturalmente infectados por *L. Infantum*;
- Os padrões histopatológicos da pele ulcerada de cães com leishmaniose visceral revelam principalmente dermatite mista caracterizada pela infiltração granulomatosa celular, enquanto os da pele íntegra demonstram dermatite liquenóide pelo mesmo infiltrado inflamatório.