PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Imunodeteção de *Leishmania infantum chagasi* em linfonodos internos de cães naturalmente infectados

---

Márcio de Barros Bandarra¹, Pamela Rodrigues Reina Moreira^{2*},
Rosemeri de Oliveira Vasconcelos³

¹ Doutorando do Programa de Medicina Veterinária, FCAV/UNESP (Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias), Jaboticabal-SP. Este trabalho é parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

² Pós-doutoranda em Patologia Veterinária, FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP.

³ Docente do Departamento de Patologia Veterinária, FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP.

* Autor para correspondência: pamela_rreina@yahoo.com.br

Resumo

A linfadenomegalia é uma alteração importante na Leishmaniose Visceral Canina (LVC), mas existem poucos estudos comparando e enfocando os linfonodos internos. O objetivo deste estudo foi avaliar a carga parasitária nos linfonodos mesentéricos e ilíacos de 17 cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum chagasi*, oriundos do município de Araçatuba (SP), área endêmica para Leishmaniose Visceral (LV). Destes animais, 10 eram sintomáticos (grupo CS) e sete eram assintomáticos (grupo SS). A imunodeteção do parasito foi feita por meio da técnica de imuno-histoquímica, com soro hiperimune de cão soropositivo para LVC. A carga parasitária foi

maior nos cães com sinais clínicos de LVC, em ambos os linfonodos. O linfonodo ilíaco apresentou a maior média de macrófagos parasitados, porém sem diferenças entre os grupos CS e SS. Com isso pode-se concluir que os cães sintomáticos tiveram a maior carga parasitária, sugerindo a visceralização do parasito *Leishmania infantum chagasi*, que parece estar relacionada com a evolução dos sinais clínicos nos cães infectados.

Palavras-chave: cães, linfadenopatia, leishmaniose visceral, imuno-histoquímica.

Immunodetection of *Leishmania infantum chagasi* in internal lymph nodes of dogs naturally infected

Abstract

The lymphadenopathy is a major change in Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), but there are few studies comparing and focusing on the internal lymph nodes. The objective of this study was to assess the parasite load in the mesenteric and iliac lymph nodes from 17 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*, coming from Araçatuba (SP), an endemic area for visceral leishmaniasis (VL). Of these animals, 10 were symptomatic (CS group) and seven were asymptomatic (SS group). Immunodetection of the parasite was taken by immunohistochemical technique with hyperimmune sera from seropositive dog for LVC. The parasite load was higher in dogs with clinical signs of CVL in both lymph nodes. The iliac lymph node had the highest average of parasitized macrophages, although no differences between CS and SS groups. With this it can be concluded that the symptomatic dogs had the highest parasite load, suggesting visceralization of the parasite *Leishmania infantum chagasi* which seems to be related to the evolution of clinical signs in infected dogs.

Keywords: dogs, lymphadenopathy, visceral leishmaniasis, immunohistochemistry.

Introdução

Na LVC, a linfadenopatia crônica é normalmente descrita em cães infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, com reatividade das zonas cortical e medular (LIMA et al. 2004), onde observa-se hiperplasia folicular na região cortical de animais assintomáticos e oligossintomáticos e atrofia folicular predominante em cães sintomáticos (GIUNCHETTI et al., 2008; MOREIRA et al., 2010, MOREIRA et al., 2013).

A LVC pode ser considerada uma doença imunomediada, já que o parasito tem capacidade para modificar o sistema imunológico do hospedeiro (SLAPPENDEL e FERRER, 1990).

Quanto à presença de formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, Giunchetti et al. (2008) e Lima et al. (2004) descreveram que nos linfonodos periféricos não há diferença de carga parasitária entre os grupos. Já Moreira et al. (2010), observaram nos linfonodos poplíteos que a densidade de parasitos era maior nos cães sintomáticos, seguidos dos oligossintomáticos e em 2013 estes mesmos autores relataram que no linfonodo subescapular havia uma diferença marcante, entre o grupo sintomático (S) em relação aos cães dos grupos oligossintomático (O) e assintomático (A). Lima et al (2004) afirmaram ainda, que a resposta imune e o número de parasitas nos órgãos dos cães podem variar grandemente de animal para animal.

A *L. (L.) chagasi* tem a capacidade de sobreviver aos mecanismos de defesa do seu hospedeiro canino. Sua principal estratégia é modular a resposta imune, causando um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, induzindo em cães susceptíveis e com maior carga parasitária, uma predominância de resposta imune humoral, com perfil de citocinas Th2, sendo ineficientes no controle da multiplicação do protozoário dentro dos macrófagos (BARBIÉRI, 2006).

Pelo fato da pesquisa direta do parasito ser feita no linfonodo poplíteo ou na medula óssea, por punção biópsia aspirativa, pouco destaque é dado aos linfonodos internos de cães com LVC. Não encontramos relatos que descrevam

se os mesmos se comportam de forma similar aos linfonodos periféricos e se existem diferenças no tropismo do parasito para estes linfonodos internos de acordo com a evolução clínica da LVC. A presença de parasitos nestes locais poderia sugerir visceralização / estágio avançado da LVC ou o parasito já poderia ser encontrado nestes linfonodos independente do cão apresentar ou não sinais clínicos da doença. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença do *L. infantum chagasi* nos linfonodos internos (mesentéricos e ilíacos) de cães infectados e comparar estes achados com a presença ou ausência de sinais clínicos de LVC.

Material e Métodos

Foram avaliados 17 cães, sendo 10 sintomáticos (grupo CS) e sete assintomáticos (grupo SS), sem predileção por raça, sexo ou idade, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (SP), região endêmica para Leishmaniose Visceral. Os animais encaminhados por proprietários ou capturados nas ruas da cidade são submetidos à eutanásia sob anestesia barbitúrica (Tiopental, Cristália Itapira, SP), conforme recomenda o código de ética para uso de animais em pesquisa científica (AVMA, 2001), mediante injeção intravenosa de cloreto de potássio¹, em cumprimento ao Decreto nº. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, que estabelece que animais domésticos portadores de LVC devem ser submetidos à eutanásia.

A necropsia dos cães foi feita imediatamente após a eutanásia e foram colhidos fragmentos de linfonodos mesentérico e ilíaco, para análise imuno-histoquímica.

Os fragmentos dos linfonodos foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (0,15 molar), pH 7,2. Após 24 horas de fixação, os fragmentos foram desidratados em soluções de concentração decrescente

---

¹ O delineamento experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da FCAV – UNESP, Câmpus de Jaboticabal (Protocolo nº. 0020676-08).

de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm para posterior realização da técnica de imuno-histoquímica.

Na análise imuno-histoquímica, para a determinação da carga parasitária, utilizou-se o Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase (kit LSAB – Dakocytomation, cód. K0690). Como anticorpo primário utilizou-se soro hiperimune de cão positivo para Leishmaniose Visceral (diluição 1:1000), segundo protocolo descrito por MOREIRA et al. (2010), modificado do protocolo de TAFURI et al. (2004). A soropositividade deste cão foi avaliada pela técnica de ELISA (título de 1:40.000). As lâminas com o anticorpo foram incubadas em câmara úmida por um período de 18 horas, a 4°C. O sistema de recuperação antigênica foi realizado pelo vapor (panela elétrica a vapor, Philips Walita), com solução de citrato de sódio 10 mM, pH 6,0. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com uma solução de metanol e peróxido de hidrogênio (Synth), 30 volumes a 3%, por 10 minutos. O bloqueio das imunomarcações inespecíficas foi feito com produto comercial (Protein Block, Dakocytomation, cód. X0909), por 20 minutos de incubação. O cromógeno utilizado foi diaminobenzidina (DAB, Dakocytomation, cód. K3468) e a contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris (Synth). O controle negativo da reação foi feito pela exclusão da incubação com o anticorpo primário. O controle positivo da presença do parasito nos linfonodos foi a pesquisa parasitária, por análise citológica, de esfregaços dos linfonodos internos corados por Panótico Rápido (Biolog).

Para a determinação da porcentagem de células imunomarcadas, consideraram-se cinco campos microscópicos, com objetiva de 40x, considerando-se todas as áreas anatômicas dos linfonodos (cápsula, seio subcapsular, cortical e medular), segundo descrito por Moreira et al. (2010). A partir dos valores obtidos nestes campos, fez-se uma média do número de macrófagos parasitados imunomarcados por animal, sendo essas médias avaliadas em cada grupo de cães com e sem sinais clínicos.

As médias das células imunomarcadas para carga parasitária nos linfonodos mesentérico e ilíaco foram submetidas ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparar os grupos de cães com e sem sinais clínicos, assim como para comparar os linfonodos dentro de cada grupo. Para a análise estatística utilizou-se o programa estatístico Graphpad Prism (versão 4.00, 2003), considerando as diferenças significativas quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

A imunomarcação do parasito nos linfonodos internos mostrou especificidade (Figura 1), pois foi restrita as formas amastigotas presentes no citoplasma de macrófagos. Nos linfonodos mesentérico e ilíaco houve um menor número de células parasitadas, quando comparado aos relatos de Moreira et al. (2010 e 2013), estudando os linfonodos poplíteo e subescapular respectivamente dos mesmos animais. Reis et al. (2009) mostraram perfis de resposta variados em diferentes órgãos de cães com LVC, denominando estas diferenças como resposta compartimentalizada de cada órgão frente à infecção. Esse padrão de resposta pode estar relacionado à proliferação ou ao controle da multiplicação do parasito nos órgãos infectados. Mesmo quando se compara diferentes linfonodos, estas respostas variadas aparecem.

Neste presente estudo ao comparar os linfonodos mesentéricos e ilíacos, notou-se que os linfonodos ilíacos apresentaram uma maior média tanto nos cães com sinais clínicos de LVC (CS / 21,02) como nos cães sem sinais clínicos (SS / 5,54), quando comparado ao linfonodo mesentérico, que teve uma média de 9,94 macrófagos imunomarcados (CS) em relação ao grupo SS (3,60). Porém não houve uma diferença estatística significativa entre os grupos nos dois linfonodos (Figura 2A e B) e também entre os linfonodos dentro de cada grupo (Figura 2C e D). O que discorda dos relatos de Moreira et al. (2010), que observaram nos linfonodos poplíteos que a carga parasitária era significativamente maior nos cães sintomáticos, seguidos dos oligossintomáticos. Em 2013, estes mesmos autores relataram que os

linfonodos subescapulares apresentaram diferença marcante, entre o grupo sintomático em relação ao oligossintomático e assintomático.

Figura 1: Fotomicrografia de linfonodo de cão com Leishmaniose Visceral (grupo sintomático). Notar a imunodeteção de *Leishmania infantum chagasi* em macrófagos da região capsular (setas) e cortical (*) no linfonodo ilíaco. Observam-se no detalhe as formas amastigotas imunomarcadas. Complexo de polímero ligado a peroxidase (Obj. de 40x).

No presente estudo concorda com os relatos de Lima et al. (2004), os quais não observaram diferenças estatísticas entre os grupos assintomático e sintomático para a carga parasitária e Giunchetti et al. (2008) descreveram também que nos linfonodos poplíteos não há uma diferença significativa para a densidade parasitária entre os grupos. Lima et al (2004) afirmaram que a resposta imune e o número de parasitas nos órgãos dos cães podem variar grandemente de animal para animal.

Figura 2: Médias de macrófagos parasitados nos linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral. Não foi observada diferença significativa entre os grupos com sinais clínicos (CS) e sem sinais clínicos (SS) tanto nos linfonodos ilíacos (A) como nos mesentéricos (B), bem como na comparação entre os linfonodos dentro de cada grupo, CS (C) e SS (D). Notar que o grupo CS apresentou as maiores médias de células parasitadas, bem como, os linfonodos ilíacos tiveram mais parasitos. Teste de Mann-Whitney ($P > 0,05$).

Neste presente estudo foram utilizados os mesmo animais do artigo de Moreira et al. (2010 e 2013), ao comparar os linfonodos internos (mesentéricos e ilíacos) deste estudo com os periféricos (poplíteos e subescapulares) observados por este autor. Portanto, pode se sugerir que os internos apresentam o menor número de parasitos que os periféricos, pois possivelmente são afetados mais tardiamente, em uma fase crônica da

infecção. Moreira e colaboradores discutem que os linfonodos subescapulares e cervicais drenam a região da cabeça, maior alvo do vetor de LVC. Estudos destacam que o linfonodo poplíteo seria comumente afetado pelo parasito, e o seu envolvimento pode indicar a visceralização do protozoário, pois a maioria dos cães com LVC apresentam esplenomegalia e hepatomegalia (FEITOSA et al., 2000). O poplíteo é o linfonodo que drena a linfa dos membros pélvicos (DYCE et al., 2004; ALVES et al., 2009). Em regiões quentes estas áreas também são muito procuradas pelo inseto vetor, principalmente na região interdigital, pois é um local de maior umidade. Já a região inguinal também é muito afetada, pois é composta por pele glabra (MOREIRA 2010). Portanto, sugere-se que os efeitos inibidores induzidos pelo protozoário teriam um tempo de ação diferenciado entre os diferentes linfonodos afetados.

Na Grécia, em um estudo com cães com LVC foi avaliada a carga parasitária dos linfonodos de 139 animais, sendo que 85% destes foram positivos para a pesquisa parasitária na análise citológica (KOUTINAS et al. 1999). Neste estudo em 17 animais, pela técnica de imuno-histoquímica, cerca de 94% dos cães tiveram imunomarcacão positiva para o parasito, confirmando que esta técnica é eficiente para determinar a presença do parasito em cães com pouca densidade de formas amastigotas nos tecidos.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos, a carga parasitária foi maior no linfonodo ilíaco, independente da manifestação clínica da LVC, porém os cães sintomáticos foram os que apresentaram o maior número de macrófagos parasitados. A visceralização da LVC parece estar relacionada com a evolução dos sinais clínicos nos cães infectados.

Referências

ALVES, C.F.; AMORIMB, I.F.G.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.128, p.349-358, 2009.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Report of the AVMA panel on euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.218, n.5, p.669-696, 2001.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, n. 28, p. 329-337, 2006.

DYCE, K.M.; SACK, W.O., WENSING, C.J.G. Sistema Cardiovascular. In: _____. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap.7, p.215-255.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.5, n.28, p.36-44, 2000.

GIUNCHETTI, R.C., MARTINS-FILHO, O.A., CARNEIRO, C.M., MAYRINK, W., MARQUES, M.J., TAFURI, W.L., CORREIA-OLIVEIRA, R., REIS, A.B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis, **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v.121, p.23-33, 2008.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical Considerations on Canine Visceral Leishmaniasis in Greece: A Retrospective Study of 158 Cases (1989–1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 35, p. 376-383, 1999.

LIMA, W.G., MICHALICK, M.S.M., MELO, M.N., TAFURI, W.L., TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 92, p. 43-53, 2004.

MOREIRA, P.R.R. **Apoptose de cães com Leishmaniose Visceral**. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

MOREIRA, P.R.R.; VIEIRA, L.M.; ANDRADE, M.M.C.; BANDARRA, M.B.; MACHADO, G.F.; MUNARI, D.P.; VASCONCELOS, R.O. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitol Res.** v.107, p.605-613, 2010.

MOREIRA, P.R.R.; BANDARRA, M.B.; MAGALHÃES, G.M.; MUNARI, D.P.; PRANDINI, M.M.; ALESSI, A.C.; VASCONCELOS, R.O. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** v.192, p.149-157, 2013.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARVALHO, A.T.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, R.C. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.128, p.87-95, 2009.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

SLAPPENDEL, R.J.; AND FERRER, L., Leishmaniasis. In: Greene, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. W.B. Saunders Co., Philadelphia, p. 450–458. 1990.