



## Alterações estruturais e marcação imunohistoquímica do parasitismo no intestino de cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)<sup>(1)</sup>

[Structural changes and immunohistochemical staining of parasites in the intestines of dogs (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) naturally infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908)]

### “Artigo Científico/Scientific Article”

L Ghinato<sup>1</sup>, FCL Maia<sup>1(\*)</sup>, LC Alves<sup>2</sup>, VL Tafuri<sup>3</sup>, MM Figueiredo<sup>3</sup>, SM Torres<sup>2</sup>, DS Pimentel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária /UFRPE, Recife-PE/Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos. Departamento de Medicina Veterinária /UFRPE, Recife-PE, Brasil..

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, Belo Horizonte – MG, Brasil.

#### Resumo

A leishmaniose visceral canina (LVC) é numa doença parasitária que se caracteriza por possuir sintomatologia embora alguns casos sejam assintomáticos. Poucos estudos sobre o parasitismo por *Leishmania* sp. no trato intestinal de cães tem sido realizados. O objetivo desta pesquisa foi descrever as alterações estruturais e a detecção imuno-histoquímica da *Leishmania (Leishmania) infantum*, através de amostras de intestino canino fixadas em formalina e embebidas em parafina. Fragmentos de intestinos de 36 cães com exames sorológicos e parasitológicos positivos para *L. (L.) infantum* foram obtidos e analisados através da histopatologia (Coloração por H.E.) e análise imuno-histoquímica (streptoavidina-peroxidase). Nenhuma alteração macroscópica foi observada. A avaliação histopatológica entretanto revelou infiltrado linfohistioplasmocitário em 88,88% dos duodenos, 86,11% dos jejunos, 97,22% dos íleos, 91,66% dos cecos, 86,11% dos cólons e 72,22% dos retos, particularmente observados na mucosa, submucosa e muscular da mucosa. Alterações circulatórias como hiperemia, hemorragia e congestão foram encontradas em 66,66% dos duodenos, 69,44% dos jejunos, 69,44% dos íleos, 77,77% dos cecos, 80,55% dos cólons e 77,77% dos retos. Formas amastigotas de *L. (L.) infantum* foram detectadas apenas através da streptoavidina-peroxidase em fragmentos de ambos intestinos delgado e grosso em 22,22% dos cães analisados.

**Palavras-chave:** Canino, intestino, histopatologia, imunomarcação.

#### Abstract

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a parasitic disease characterized by a clinical or asymptomatic form. Few studies of parasitism of *Leishmania* sp in intestinal tract in dogs have been undertaken. The goal of this research was to describe the structural changes and the Immunohistochemical detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine intestines. Fragments of intestines from 36 dogs with a positive parasitological and serological exams for *L. (L.) infantum* were obtained and analyzed by histopathology (Hematoxylin and Eosin stain -HE) and immunohistochemistry assays (strepto-avidin-peroxidase). No macroscopic changes were found. Histopathological evaluation showed lymphohistiocytic- plasmocytes infiltrates in 88,88% of duodenum, 86,11% of jejunum, 97,22% of ileum, 91,66% of cecum, 86,11% of colon and 72,22% of rectum section, particularly in the mucous membrane, submucosa and muscularis mucosae. The circulatory changes as hyperemia, hemorrhages and congestion were found in 66,66% of duodenum, 69,44% of jejunum, 69,44% of ileum, 77,77% of cecum, 80,55% of colon and 77,77% of rectum fragments. Amastigotes forms of *L. (L.) infantum* were detected only by strepto-avidin-peroxidase in from both small and large intestine fragments (22,22%).

**Key words:** Canine, intestine, histopathology, immunostaining.

(\*) Autor para correspondência/Corresponding author: Departamento de Medicina Veterinária /UFRPE. Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP-52171 900 Recife-PE/Brasil. e-mail: fred54@hotmail.com

Recebido em: 29 de abril de 2011

Aceito em: 20 de junho de 2011

## Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é endêmica em 65 países, (DAVIDSON, 1999; DESJEUX, 2004). Nas Américas, cerca de 90% dos casos humanos de Leishmaniose Visceral Americana (LVA) têm sido registrados no Brasil (MILES et al., 1999; DESJEUX, 2002; ALVES, 2006). Segundo Maia-Elkhoury et al. (2008) entre 1980 e 2005 o Brasil registrou 59.129 casos de leishmaniose visceral, sendo 82,5% na Região Nordeste.

Nas Américas, a LV é causada pelo protozoário *Leishmania* (*Leishmania infantum*) (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; MILES et al., 1999) sendo transmitida ao homem e ao cão pela picada dos insetos do gênero *Lutzomyia*, sendo o cão o principal reservatório da doença no ambiente urbano (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; POCAI et al., 1998; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000; BLAVIER et al., 2001; IKEDA-GARCIA et al., 2003; LANGONI et al., 2005).

A infecção humana é clinicamente semelhante à doença canina, entretanto, os cães com sintomatologia, além do comprometimento visceral, tais como baço, medula óssea, fígado e rins (TAFURI et al., 1989; SANTOS-GOMES et al., 2000; FEITOSA, 2006; LUVIZOTTO, 2006), também apresentam lesões de pele (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; SANTOS-GOMES et al., 2000; KRAUSPENHAR et al., 2007; SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008).

Contudo, outras formas clínicas podem estar presentes incluindo os distúrbios cardíacos, respiratórios, neurológicos e digestivos (SLAPPENDEL, 1988; FERRER, 1999; VINUELAS et al., 2001; SILVA et al., 2002; LUVIZOTTO, 2006; FERRARI et al., 2006).

Em relação ao trato gastrointestinal é possível observar cães com quadros clínicos de diarreia crônica e enterite hemorrágica (FERRER et al., 1991; DENEROLLE, 1996; FEITOSA, 2001; CIARAMELLA e CORONA, 2003; FEITOSA, 2006). Segundo Ferrer et al. (1991) e Luvizotto (2006) podem ocorrer

hiperemia difusa e focos de erosão na mucosa do cólon.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi descrever os achados estruturais e de presença de marcação imunohistoquímica do parasitismo em fragmentos de intestinos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania infantum*).

## Material e Métodos

Foram utilizados seis fragmentos dos intestinos de 36 cães; sendo três do delgado (um de duodeno, um de jejuno e um íleo) e três do grosso (um do ceco, um do cólon e um do reto); com sorologia positiva IgG anti *Leishmania infantum* pelo teste de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) sendo confirmada a infecção pelo exame parasitológico. Os fragmentos foram cedidos, após necropsia, pelo Centro de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde de Petrolina, tendo sido devidamente acondicionados em solução tamponada de formalina a 10%.

Em laboratório foram processados em duplicata: um para HE e outro para Imunohistoquímica, de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados com espessura entre 4-5 µm e montados em lâminas histológicas coradas em hematoxilina-eosina (H.E) e imunomarcação pela streptoavidina-peroxidase, sendo as análises posteriormente realizadas em microscopia óptica.

## Resultados e Discussão

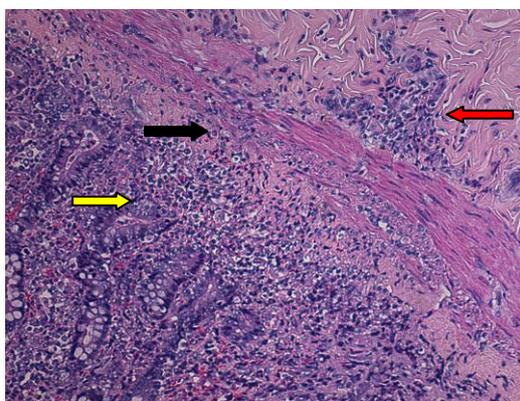
Macroscopicamente nenhuma lesão foi observada nos fragmentos de intestino delgado e grosso.

Os resultados assemelham-se aos encontrados por Adamama-Moraitou et al. (2007), que ao avaliarem biópsias do cólon em cães, naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* e; ao realizarem imunohistoquímica, não observaram alterações macroscópicas em 67,7% e 8,7% das amostras, respectivamente e; por Silva et al. (2002) que também não observaram nenhuma lesão macroscópica importante no

duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon em um cão com LVC.

Neste estudo, a alteração histopatológica mais frequentemente encontrada foi a reação inflamatória linfohistioplasmocitária, ocorrendo em 88,88% (32/36) dos duodenos, 86,11% (31/36) dos jejunos, 97,22% (35/36) dos íleos, 91,66% (33/36) dos cecos, 86,11% (31/36) dos cólons e 72,22% (26/36) dos retos (Figura 1). Estas reações inflamatórias podiam ser visualizadas, principalmente, em mucosas, submucosas e musculares das mucosas.

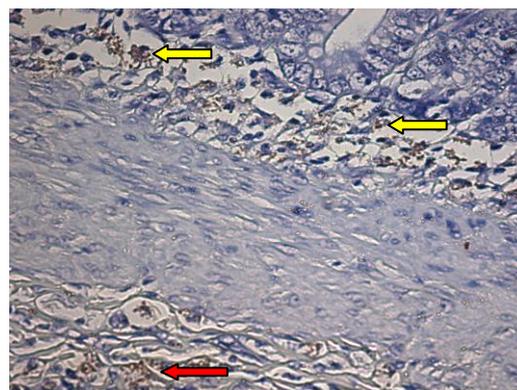
Os resultados encontrados neste estudo assemelham-se aos observados por Luvizotto (2006) que relata reação inflamatória linfohistioplasmocitária intensa, comprometendo mucosa, submucosa e muscular da mucosa, onde formas amastigotas da *L. (L.) infantum* são comumente identificadas no interior de macrófagos. Por outro lado, diferem dos achados relatados por Adamama-Moraitou et al. (2007) que ao trabalharem com biópsias do cólon de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* e não confirmados pela técnica de imunohistoquímica não observaram nenhum tipo de reação inflamatória ao exame histopatológico em 67,7% (21/31) dos animais estudados, talvez pela intensidade do comprometimento da mucosa que pode ser variável.



**Figura 1.** Jejuno de cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Inflamação linfohistioplasmocitária na mucosa (seta amarela), na muscular da mucosa (seta preta) e submucosa (seta vermelha). HE. 220X

Alterações circulatórias, tais como, hiperemia, hemorragia e congestão foram observadas em 66,66% dos duodenos, 69,44% dos jejunos, 69,44% dos íleos, 77,77% dos cecos, 80,55% dos cólons e 77,77% dos retos. Nossos resultados assemelham-se aos achados observados por Carvalho (2010) que trabalhando com 8 cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* e oito cães experimentalmente infectados, também encontrou congestão no íleo destes cães, sendo mais pronunciada nos animais experimentalmente infectados.

A presença de formas amastigotas de *L. (L.) infantum* no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ceco, cólon e reto) pela streptoavidina-peroxidase foi confirmada em 22,22% (8/36) dos cães analisados (Figura 2).



**Figura 2.** Ceco de um cão naturalmente infectado com *L. (L.) infantum*. Imunomarcção positiva de formas amastigotas de *L. (L.) infantum* na mucosa (seta amarela) e na submucosa (seta vermelha) pelo método imuno-histoquímico em Estreptoavidina-Peroxidase. IHQ 440X.

Os resultados aqui observados assemelham-se aos achados observados por Silva et al. (2002) que relatam o caso clínico de um cão naturalmente infectado por *L. (L.) infantum*, em que foi confirmada a presença de formas amastigotas pela técnica de imunohistoquímica pela estreptoavidina-peroxidase no duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon, onde o maior comprometimento observado foi da mucosa e submucosa, respectivamente. Esses resultados também são semelhantes aos achados observados por Ferrer et al. (1991)

que relataram o caso clínico de dois cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, cuja a presença de formas amastigotas foi confirmada pela técnica de imuno-histoquímica pela peroxidase no segmento cólon de cada cão. Assemelham-se também aos achados encontrados por Adamama-Moraitou et al. (2007) que ao trabalharem com biópsias do cólon de cães, naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, também observaram a presença de formas amastigotas na mucosa do cólon de 32,3% (10/31) dos cães pela técnica de imunohistoquímica, porém deve-se ressaltar que reações inflamatórias podem ser decorrentes também de coinfeções produzidas por outras parasitas.

### Conclusões

De acordo com os achados deste estudo, a ocorrência da reação inflamatória linfocitoplasmocitária nos intestinos delgado e grosso de cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* é a mais expressiva lesão observada.

A marcação imunohistoquímica pela streptoavidina-peroxidase confirmou a presença de formas amastigotas *L. (L.) infantum* em segmentos dos intestinos delgado e grosso.

### Referências

ADAMAMA-MORAITOU, K.K. et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, v. 76, n. 1, p. 53-57, 2007.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, [ s. l. ], v. 57, p. 1-87, 2004.

ALVES, W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, v.1, 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: **Organización Panamericana de Salud**, 2006, p. 94-98.

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

CARVALHO, R.M.A. **Aspectos histopatológico da mucosa intestinal de cães naturalmente e experimentalmente infectados com leishmania chagasi**. 2010. 46f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Universidade Federal da Bahia, Bahia.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Naples, v. 25, n. 5, p. 358-368, 2003.

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

DAVIDSON, R.N. Leishmaniasis in humans, with particular reference to leishmaniasis with a canine reservoir. In: CANINE LEISHMANIASIS, 1999, Barcelona, **Proceedings...** Barcelona: Killick-Kendrick, 1999. p. 46-53.

DENEROLLE, P. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). **Pratique Médecine Chirurgie Animal Compagnie**, La Seyne-Sur-Mer, v. 31, n. 2, p. 137-145, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v. 2, p. 692 -693, 2004.

DESJEUX, P. Urbanisation of the leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2002, Sevilla, **Proceedings...** Sumène: Killick-Kendrick, 2002. p. 49-55.

FEITOSA, M.M. Avaliação clínica de animais naturalmente infectados. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 9 – 14.

FEITOSA, M.M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. **Revista Intervet Pet**, [ s. l. ], p. 1- 15, 2001.

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

FERRARI, H.F.; RIBEIRO, D.; LUVIZOTTO, M.C.R. Miocardite associada à *Leishmania* sp em cão-relato de caso. In: I FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal, **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 48.

- FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS, 1999, Barcelona, **Proceedings...** Barcelona: Killick-Kendrick, 1999. p. 6-10.
- FERRER, L.M. et al. Chronic colitis due to leishmaniasis infection in two dogs. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v. 28, p. 342-343, 1991.
- IKEDA-GARCIA, F.A. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 47, p. 42-47, 2003.
- KRAUSPENHAR, C. et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.
- LANGONI, H. et al. American visceral leishmaniasis: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 11, n. 3, 2005.
- LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 15 – 22.
- MAIA-ELKHOURY, A.N.S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.12, p. 2941-2947. 2008.
- MILES, M.A. et al. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies. From canine leishmaniosis; an update. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Killick-Kendrick, 1999. p. 46-53.
- NICOLLE, C.J. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de leishman observés en Tunisie. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, local, v. 3, p. 1-26, 1908.
- NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**, Milán, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.
- POCAI, E.A. et al. Leishmaniose visceral (calazar), cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.
- SANTA-ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.
- SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of leishmania infantum romastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 2, p. 193-198, 2000.
- SILVA, F.L. et al. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a case report 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 340-344, 2002.
- SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. **The Veterinary Quarterly**, Netherlands, v. 10, n. 1, p. 1-16, 1988.
- SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Canine leishmaniosis a challenging zoonosis. **European Journal of Comparative Animal Pathology**, [ s. l. ], v. 18, n. 3, p. 232-241, 2008.
- TAFURI, W.L. et al. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 139 -145, 1989.
- VINUELAS, J. et al. Menigial leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.101, p.23-27, 2001.