

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

**MÉTODO PARA ANÁLISE DE ASPIRADO ESPLÊNICO DE CÃO:
DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS APLICÁVEIS AO
MONITORAMENTO DE VARIAÇÕES DE POPULAÇÕES
LEUCOCITÁRIAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Por

STELLA MARIA BARROUIN MELO

ORIENTADOR: DR. LAIN CARLOS PONTES DE CARVALHO

SALVADOR
Julho de 2005

STELLA MARIA BARROUIN MELO

**MÉTODO PARA ANÁLISE DE ASPIRADO ESPLÊNICO DE CÃO:
DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS APLICÁVEIS AO
MONITORAMENTO DE VARIAÇÕES DE POPULAÇÕES
LEUCOCITÁRIAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Imunologia pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

Salvador – Bahia, 2005.

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Melo, Stella Maria Barrouin
M528m Método para análise de aspirado esplênico de cão: desenvolvimento de
ferramentas aplicáveis ao monitoramento de variações de populações
leucocitárias na Leishmaniose visceral [manuscrito] / por Stella Maria
Barrouin Melo. – 2005.
102 f. : il. ; 29 cm

Datilografado (fotocópia)
Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

Orientador: Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, Laboratório de
Patologia e Biointervenção.

1. Leishmaniose visceral. 2. Cão. 3. Imunocitoquímica. I. Título.

CDU 616.993.161:595.323

TERMO DE APROVAÇÃO

STELLA MARIA BARROUIN MELO

MÉTODO PARA ANÁLISE DE ASPIRADO ESPLÊNICO DE CÃO: DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS APLICÁVEIS AO MONITORAMENTO DE VARIAÇÕES DE POPULAÇÕES LEUCOCITÁRIAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Imunologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia, no Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, pela banca examinadora:

Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

Orientador

Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brasil.

Prof. Dr. Jackson Maurício Lopes Costa

Laboratório de Imunoparasitologia - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brasil.

Prof.^a Dr.^a Margarida Maria de Lima Pompeu

Departamento de Patologia e Medicina Legal - Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

Prof. Dr. Ajax Mercês Atta

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Farmácia
Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Departamento de Bio-Interação - Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

Salvador, 26 de julho de 2005.

Dedico este trabalho à minha família, agradecendo-a, acima de tudo, pela compreensão, pelo apoio, pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às Instituições:

Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM)
Universidade Federal da Bahia (PPGIm – ICS)

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho:

Aos pesquisadores do CPqGM, em especial à Dra. Milena Botelho Pereira Soares, ao Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, ao Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira, à Dra. Tânia Correia e à Dra. Conceição Queirós.

Aos funcionários do CPqGM Elivani de Jesus, Sérgio Vasconcelos e Ana Maria Fiscina.

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Bio-Intervenção - CPqGM.

Aos orientandos de Iniciação Científica Silvana Ornelas Santos, Adenizar Delgado das Chagas Jr., Alisson Azevedo Pinheiro, Míriam Flores Rebouças e Adriana Maurício do Carmo.

Ao Dr. Moacir Paranhos e a Mariza Paixão, do Laboratório Central do Estado da Bahia.

Aos Médicos Veterinários Joelma Trigo, Fred da Silva Julião, Ivan Silva, Sandra Moura e Maria Zoraida Daltro de Oliveira.

Aos membros da Banca Examinadora Dr. Jackson Costa, Dra. Margarida Pompeu, Dr. Ajax Atta e Dr. Roberto Meyer, pela contribuição, com suas sugestões e críticas, para o aprimoramento desta Tese.

Muito obrigada a Daniela Farias Laranjeira, pela participação amiga e incansável.

Minha gratidão ao Dr. Washington Luís Conrado dos Santos, pelo incentivo e pela inestimável ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao grande amigo Prof. Paulo Henrique Palis Aguiar, muito agradeço pela presença e pela colaboração.

Meus agradecimentos sinceros ao meu orientador, Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, pela atenção, disponibilidade e apoio, cuja orientação permeada principalmente pelos ensinamentos e pelo exemplo, em muito me orgulha.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. HIPÓTESE DO TRABALHO	13
3. OBJETIVOS	13
4. JUSTIFICATIVA	14
5. METODOLOGIA GERAL	16
6. PUBLICAÇÕES E MANUSCRITOS	19
6.1. Publicação: <i>Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of <u>Leishmania</u> <u>chagasi</u> infection in dogs.</i>	19
6.2. Publicação: <i>Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals</i>	25
6.3. Manuscrito: <i>A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis</i>	36
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
8. CONCLUSÕES	81
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	82
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
11. APÊNDICES.....	96

SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CD	Cluster Differentiation (do inglês)
CCL	Quimiocinas constitutivas de linfócitos (do inglês)
DAB	do inglês, 3,3'- <i>diaminobenzidine</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático por adsorção em placa (do inglês)
FACS	Separador de células ativado por fluorescência (do inglês)
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos (do inglês)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (do inglês)
HE	Hematoxilina-Eosina
HBSS	Solução salina tamponada de Hank's (do inglês)
IFN- γ	Interferon-gama
IL-4	Interleucina – 4
IL-10	Interleucina – 10
IL-12	Interleucina – 12
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
M-CSF	Fator estimulador de colônias de monócitos (do inglês)
NNN	Meio de cultivo de <i>Leishmania</i> (Novy, MacNeal and Nicolle's medium)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês)
RPMI	Meio RPMI-1640 para cultivo celular (do inglês)
TGF- β	Fator de Crescimento e Transformação – beta (do inglês)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – alfa (do inglês)

RESUMO

Introdução: Este estudo centrou-se no desenvolvimento de um método para análise do baço do cão como órgão-alvo de avaliação diagnóstica, objetivando caracterizar componentes celulares da resposta imune *in situ* na infecção por *Leishmania chagasi*, dado o papel desse animal como reservatório em áreas endêmicas da doença. **Metodologia:** O estudo foi desenvolvido em uma seqüência de experimentos, envolvendo cães saudáveis e portadores de leishmaniose visceral canina (LVC) para: (i) determinar a sensibilidade de testes parasitológicos realizados com amostras de aspirados esplênicos e do linfonodo poplíteo no diagnóstico confirmatório da infecção em 64 cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*; (ii) avaliar a segurança da biópsia aspirativa com agulha fina em cães, como procedimento para obtenção de amostras para análise em laboratório, sendo a técnica utilizada em 209 animais que apresentavam condições clínicas variando de ausência de sinais a quadros terminais de LVC; e (iii) padronizar técnicas para a análise de amostras de baço, por meio de coloração citotóxica com corante de Wright e hematoxilina-eosina, e marcação imunocitoquímica com anticorpos monoclonais, e aplicá-las na avaliação da composição celular esplênica de 14 cães saudáveis e 15 portadores de LVC. **Resultados:** Na primeira abordagem, foi obtida uma taxa de detecção de parasitos de 74% em aspirados esplênicos, em comparação com 18% em aspirados de linfonodo, indicando o uso de aspirados de baço como amostras de escolha para o diagnóstico parasitológico da doença. Em seguida, a avaliação do risco potencial da punção aspirativa de baço, objetivando a obtenção de amostras para análise das células do sistema imune do cão nesse órgão, mostrou que o procedimento não causou efeitos adversos e pôde ser considerado eficaz e seguro. Na etapa subsequente, o método desenvolvido permitiu a identificação de diferenças significativas entre as populações de leucócitos esplênicos e do sangue periférico nos diferentes grupos, incluindo alterações associadas à doença. Todos os resultados são discutidos. **Conclusão:** A avaliação de aspirados de baço com o método proposto constitui uma contribuição potencial ao estudo do sistema imune do cão, com a perspectiva de ser aplicado como uma ferramenta analítica no monitoramento da resposta imune esplênica *in situ* em pesquisas com imunoterápicos e preparações candidatas a vacina contra a LVC.

ABSTRACT

Introduction: This study was focused on the development of a method for the analysis of the canine spleen as a target organ for diagnostic evaluation, aiming to characterize cellular components of the *in situ* immune response to infection by *Leishmania chagasi*, since the dog stands as reservoir of the parasite in endemic areas of the disease. **Methods:** The study was developed in a sequence of experiments, involving healthy dogs and dogs with canine visceral leishmaniosis (CVL), to: (i) determine the sensitivity of confirmative parasitological diagnosis, comparatively using samples of spleens and popliteal lymph nodes from 64 seropositive animals for antibodies anti-*Leishmania*; (ii) evaluate the safety of the fine-needle biopsy of canine spleen as a sampling procedure for laboratory analysis, by performing the technique on 209 dogs with a wide variety of clinical conditions of CVL, from absence of signs to a terminal picture of disease; and (iii) standardize and validate procedures for the analysis of spleen samples by means of cytochemical staining, with Wright's and hematoxylin-eosin techniques, and immunocytochemistry using monoclonal antibodies, applying them in the evaluation of the cellular splenic composition of 14 healthy non-infected dogs and 15 dogs with CVL. **Results:** In the first approach, our results, demonstrating 73% of *Leishmania* detection rate in spleen samples, in comparison with the 18% rate in lymph node cultures, supported the use of spleen instead of lymph node as the organ of choice for the parasitological diagnosis of the disease. Then, the evaluation of the potential risks of the fine needle spleen biopsy showed that the procedure did not cause adverse side effects and could be considered efficacious and safe for providing samples for laboratorial analysis of cells of the canine immune system in this organ. Afterwards, the standardized techniques allowed the distinction of significant differences among leukocyte populations from blood and spleen in both dog groups, including changes associated to disease. All results are discussed. **Conclusion:** The evaluation of spleen aspirates with the method described herein constitute a potential contribution to the study of the canine immune system, having the perspective of being applied as an analytical tool for the monitoring the immune response in the canine spleen in research for the development of immunotherapy or vaccine against CVL.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dificuldades no controle da leishmaniose visceral: um problema de Saúde Pública

Estima-se que o crescimento mundial da leishmaniose visceral (LV) humana seja da ordem de 500.000 novos casos anuais, com envolvimento crescente de novas áreas endêmicas, inclusive em países anteriormente livres da doença (WHO, 2000) e regiões para onde está ocorrendo migração e adaptação do inseto vetor, como as áreas peri-urbanas e urbanas (COSTA et al., 1990; MICHALIK et al., 1992; NASCIMENTO et al., 1992; MARZOCHI et al., 1994; MORENO & ALVAR, 2002). Fatores como a desnutrição e a deficiência ou ausência de saneamento básico são característicos da maioria das regiões endêmicas (BADARÓ et al., 1986). O advento da AIDS, determinando um comprometimento do sistema imune, favorece e agrava a situação (WHO, 2000).

A LV é causada pela *Leishmania infantum* no Velho Mundo e pela *Leishmania chagasi* no Novo Mundo, sendo ambas pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* (WHO, 1990). No Brasil, onde calcula-se que ocorram cerca de 90% de todos os casos de LV relatados nas Américas Central e do Sul, cães domésticos e raposas (*Cerdocyon thous* e *Dusycion vetulus*) são considerados os principais reservatórios naturais do parasito (DEANE & DEANE, 1955; COURTENAY et al., 1996). Os programas governamentais para controle da doença seguem as determinações da OMS, que preconizam a identificação e o tratamento dos casos humanos, o uso de inseticidas para controle do vetor e a eliminação (termo utilizado em várias publicações) dos cães que apresentem anticorpos contra *Leishmania* em inquéritos sorológicos (WHO 1990).

O sacrifício indiscriminado de cães soropositivos, além de ser uma medida onerosa, encontra resistência ética e emocional (NEOGY et al., 1994), sendo questionada sua eficiência na redução da incidência da doença humana (TESH 1995; DYE 1996; PARANHOS-SILVA et al., 1998).

O insucesso dos programas de controle da LV no Brasil, entre outros fatores, pode ser atribuído a testes pouco sensíveis, rotineiramente utilizados para inquéritos sorológicos, como a reação de imunofluorescência indireta. Assim, uma parcela de cães infectados não é identificada, permanecendo como reservatório por longos períodos (PARANHOS-SILVA et al., 1996). Além disso, o combate ao inseto vetor é prejudicado pelo desconhecimento dos seus locais de reprodução e pelo alto custo dos inseticidas indicados, gerando freqüentes descontinuidades (JERONIMO et al., 1994). Por outro lado, as medidas de controle dos reservatórios silvestres são de difícil execução, tendo em vista que sua biologia é pouco conhecida, além do fato de que a captura e o sacrifício desses animais poderiam contribuir para a extinção de algumas espécies (GENARO 1992).

1.2. A leishmaniose visceral canina: um problema de Saúde Pública e da Medicina Veterinária

A importância do cão na epidemiologia da LV decorre do fato de ser a enfermidade mais prevalente na população canina do que na humana, além do cão apresentar um índice de parasitismo cutâneo mais elevado (FEITOSA et al., 2000). Inquéritos sorológicos sugerem que a ocorrência da infecção canina nas áreas endêmicas é elevada, atingindo cifras superiores a 20 % (QUINNELL et al., 2001). Dados obtidos com a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) indicam que o exame sorológico deixa de identificar um número elevado de cães infectados, podendo os índices reais de infecção chegar até a 80% dos animais em áreas endêmicas (ASHFORD et al., 1995; BERRAHAL et al., 1996). Mesmo em regiões onde o índice de infecção humana é baixo, a leishmaniose visceral canina (LVC) pode mostrar uma alta prevalência (PARANHOS-SILVA et al., 1998).

Por outro lado, os clínicos veterinários, à medida que incorporam em seu instrumental técnicas mais específicas de diagnóstico, como o ensaio imunoenzimático por adsorção em placa (ELISA) e a PCR, o que favorece um aumento de laudos diagnósticos positivos, vêm sendo cada vez mais solicitados a tratar os animais infectados, cujos donos recusam-se a entregá-los para o sacrifício. Fármacos leishmanicidas de uso terapêutico humano vêm sendo empregados para

esse fim, devido à carência de substâncias adequadas à terapêutica do cão (AMUSATEGUI et al., 1995). Contudo, esses compostos apresentam eficácia relativa, sendo freqüentes as recidivas e o desenvolvimento de refratariedade nos cães (NEOGY et al., 1994; SLAPPENDEL & TESKE 1997; VALLADARES et al., 1998). Esses fatores representam risco epidemiológico, possibilitando a seleção de cepas de *Leishmania* resistentes à quimioterapia (VEXENAT et al., 1998; MORENO et al., 1999).

1.3. A natureza da resposta protetora ou de susceptibilidade na leishmaniose visceral canina e possibilidade de imuno-intervenção na doença

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório, cuja patogenia depende de um ambiente favorável no hospedeiro. Assim, o uso de agentes imunomoduladores pode representar uma importante alternativa terapêutica a ser explorada, devendo também compor as bases da elaboração de uma vacina canina contra a infecção. Abordagens imunoterapêuticas e/ou vacinais bem-sucedidas tornariam os cães de áreas endêmicas incapazes de transmitir o parasito ao flebótomo, contribuindo para o controle da infecção humana.

Relatos de grupos de pesquisa em diferentes regiões do mundo, reportando estudos com candidatos a vacina para utilização no cão (OGUNKOLADE et al., 1988; DUNAN et al., 1989; MAYRINK et al., 1996; LASRI et al., 1999; SILVA et al., 2000; PANARO et al. 2001; GRADONI et al., 2001; RAMIRO et al., 2003; MOHEBALI et al., 2004), enfatizaram a importância da existência de um mecanismo eficaz voltado para a prevenção da doença, centrado neste hospedeiro, como medida de controle no ambiente endêmico. Além disso, a perspectiva de protocolos imunoterapêuticos caninos eficazes, como opção entre as medidas de controle da transmissão em áreas endêmicas, tem estimulado a pesquisa na busca de reagentes capazes de modificar a resposta imune canina ao parasito (NEOGY et al., 1994; GUARGA et al., 2002; SANTOS et al., 2003; BORJA-CABRERA et al., 2004). Agentes imunomoduladores, associados ou não a quimioterapia, poderiam ser capazes de tornar cães portadores de infecção ativa em indivíduos não transmissores e resistentes a uma possível re-infecção. A manutenção desses

animais nas áreas endêmicas minimizaria a introdução de novos animais, freqüentemente jovens e susceptíveis, geralmente propensos ao desenvolvimento de altas cargas parasitárias cutâneas após a infecção natural (GUARGA et al., 2000; TRAVI et al., 2002), representando também uma alternativa ao sacrifício de animais de estimação, que torna a população relutante em colaborar com as medidas atualmente aplicadas pelo sistema de Saúde Pública no Brasil.

Estudos realizados em cães com infecção natural ou experimental com *L. chagasi* e *L. infantum* têm revelado que muitos animais sobrevivem à infecção, desenvolvendo uma resposta imune celular contra o parasito que resulta em resistência (POZIO et al., 1981; ABRANCHES et al., 1991; CABRAL et al., 1992; GENARO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1993; PINELLI et al., 1994). Estes achados estimulam estudos para o desenvolvimento de uma vacina e/ou de agentes imunoterápicos contra a leishmaniose visceral canina (LVC).

Alguns resultados experimentais indicam que o controle da infecção canina segue um padrão de resposta predominantemente celular (DEPLAZES et al., 1995; PINELLI et al., 1995), do tipo Th1. Este padrão de resposta imune tem sido também relacionado à resistência contra a infecção por *Leishmania* no camundongo e no homem (LIEW & O'DONNELL 1993; REINER et al., 1995), nos quais verificou-se que a formação de granulomas organizados está associada ao controle da infecção em órgãos-alvo, como o fígado e o baço (ENGWERDA & KAYE, 2000).

A LVC ativa é caracterizada por uma intensa resposta imune humoral e uma incapacidade dos linfócitos T de responder aos antígenos de *Leishmania in vitro*. Modificações nas sub-populações de linfócitos ocorrem em uma fase bastante precoce da infecção, levando a uma intensa depressão do funcionamento dos linfócitos T, cuja intensidade é diretamente proporcional à gravidade do quadro clínico (PINELLI et al., 1994; MORENO et al., 1999; GUARGA et al., 2002).

Diversos fatores, como a virulência da cepa infectante de *Leishmania*, a composição genética do hospedeiro, as suas condições de saúde por ocasião da inoculação do parasito (DYE 1992), a dose inoculante (MENON & BRETSCHER 1998; POWER et al., 1998; ROGERS & CROFT 1999), o sítio de inoculação (NABORS et al., 1995) e substâncias presentes na saliva do vetor (MBOW et al.,

1998) parecem contribuir para uma resposta imune desfavorável do hospedeiro. Esta resposta de susceptibilidade é caracterizada pela presença das citocinas IL-4 e IL-10, que inibem a produção de citocinas indutoras da resposta celular, como o IFN- γ e a IL-12 (LI et al., 1997; MBOW et al., 1998; KOLE et al., 1999; SATO et al., 2000). No cão, foi descrita uma resposta anérgica causada por intensa perda de células T auxiliaadoras CD4⁺, decorrente de uma possível apresentação defeituosa dos antígenos de *Leishmania* pelos macrófagos infectados, levando à apoptose dos linfócitos (MORENO et al., 1999). Uma associação entre redução nas proporções de células T do sangue periférico de cães susceptíveis e uma alta infectividade a flebótomos já foi também demonstrada (GUARGA et al., 2000).

Por outro lado, vários autores têm demonstrado a importância das citocinas do tipo Th1 na capacidade do hospedeiro canino, como do murino, em combater a infecção por *Leishmania* (PINELLI et al., 1995; MAEKAWA et al., 1998) e responder à quimioterapia (LI et al., 1997; KOLE et al., 1999; MORENO et al., 1999; ENGWERDA et al., 2002). Nestes indivíduos, uma ativação de macrófagos por citocinas Th1, principalmente o IFN- γ , conduziria à destruição ou inibição do crescimento das formas parasitárias intracelulares, envolvendo a produção de óxido nítrico (REINER & LOCKSLEY 1995).

Ensaios com administração de citocinas e indutores da produção de citocinas (YEUNG et al., 1998; WATANABE et al., 1999), conjuntamente com frações antigênicas parasitárias, têm apresentado resultados promissores (SCHOPF et al., 1999), que reforçam a possibilidade de desenvolvimento de protocolos efetivos para imunoterapia e imunoprevenção. A tecnologia de vetores virais e bacterianos, assim como as vacinas de DNA, podem favorecer a administração de citocinas únicas ou múltiplas, em combinação com antígenos ou proteínas fusionadas do tipo antígeno-citocina, aumentando a eficiência da resposta imune (LOWENTHAL et al., 1999).

Essas perspectivas apontam para o possível desenvolvimento e aplicação de reagentes imunológicos no controle e tratamento da LVC, exigindo o aprimoramento de ferramentas para estudo do sistema imune canino.

1.4. O baço como órgão de estudo na leishmaniose visceral canina

Nos últimos anos, o conhecimento das bases imunológicas órgão-específicas de doenças auto-imunes ou dos mecanismos utilizados por vírus ou bactérias para resistir à resposta imune do hospedeiro em seus órgãos de eleição vem tendo um avanço significativo (ENGWERDA & KAYE, 2000). Estudos com modelos murinos de LV têm contribuído para um progresso substancial na compreensão de eventos imunológicos e inflamatórios que ocorrem em órgãos-alvo, envolvidos na resposta imune protetora ou lesiva ao hospedeiro, no curso da infecção (BRADLEY & KIRKLEY, 1977; WILSON et al., 1996; MELBY et al., 2001; KAYE et al., 2004).

Em camundongos geneticamente susceptíveis (SMELT et al., 1997), assim como em seres humanos (GUERIN et al., 2002) ou em cães (NATAMI et al., 2000; TAFURI et al., 2001), a medula óssea, o fígado e o baço são os sítios mais importantes de crescimento parasitário e de modificações fisiopatológicas induzidas pelas cepas viscerotrópicas de *Leishmania*.

Na infecção experimental com *Leishmania*, ocorre no fígado murino um rápido crescimento de formas amastigotas até 28 dias, seguido de desaparecimento do parasito em torno de 60 dias pós-infecção (ENGWERDA et al., 2004). A eficiência da resposta imune em controlar e eliminar a infecção no fígado é atribuída à formação eficiente de granulomas em torno de células de Kupffer infectadas, associada à presença de citocinas TNF, IL-12 e IFN- γ , e à geração de derivados reativos de oxigênio e nitrogênio (KAYE et al., 2004). Por outro lado, no baço e na medula óssea, a infecção torna-se crônica, perdurando por toda a vida do animal (BRADLEY & KIRKLEY, 1977; WILSON et al., 1996), associada a uma série de alterações patológicas, principalmente definidas na arquitetura e nas funções imunológicas esplênicas (MELBY et al., 2001; ENGWERDA et al., 2002). Quantidades elevadas de TNF- α são associadas a uma remodelagem da micro-arquitetura esplênica, a qual é caracterizada por formação insuficiente de granulomas, desorganização e atrofia da polpa branca, hipertrofia da polpa vermelha e presença de macrófagos densamente infectados, difusamente dispersos em todo o órgão (ENGWERDA et al., 2002). Ocorre também aumento da expressão de IL-10 e TGF- β , citocinas inibidoras das funções fagocitárias (MELBY et al., 2001) e intensificação da atividade hematopoiética esplênica, associada a elevações na expressão de GM-CSF, G-

CSF, e M-CSF (COTTERELL et al., 2000). Foi ainda demonstrado que, na infecção por *Leishmania*, células do estroma esplênico são capazes de gerar células dendríticas constitutivamente produtoras de IL-10 com função indutora da diferenciação de células T CD4⁺ regulatórias, que promovem tolerância imunológica *in vivo* (SVENSSON et al., 2004). A presença de formas amastigotas inibe ativamente a produção de IL-12 pelos macrófagos, por meio de vias entre as quais ocorre produção de TGF- β , em fases iniciais da infecção (ENGWERDA et al., 2004). Ocorrem no baço, também precocemente, eventos críticos que vão determinar a evolução da infecção, como perda de macrófagos da zona marginal, redução na expressão de quimiocinas por células estromais, como CCL21 e CCL19, associadas ao recrutamento de células T para as regiões peri-arteriolares, além de perda da capacidade de migração das células dendríticas (ATO et al., 2002).

A dicotomia observada entre a resposta imune hepática e esplênica à infecção, ambas sob a influência do TNF- α , demonstra a importância do conhecimento dos eventos imuno-inflamatórios peculiares a cada órgão, na compreensão dos mecanismos ligados à resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção pela *Leishmania* (ENGWERDA et al., 2004).

Muito pouco sabe-se acerca de componentes e eventos ligados à eficiência ou a distúrbios inerentes à resposta imune *in situ*, nos órgãos-alvo da infecção canina por *L. chagasi* ou *L. infantum* (SANCHEZ et al., 2004). De forma semelhante ao observado em seres humanos e camundongos susceptíveis (KAYE et al., 2004), a esplenomegalia é um dos sinais mais frequentemente descritos na LVC (SLAPPENDEL 1988; CIARAMELLA et al., 1997; BLAVIER et al., 2001; TRAVI et al., 2001; SANCHEZ et al., 2004). As principais alterações histopatológicas no baço de cães portadores de infecção natural (TRYPHONAS et al., 1977; NATAMI et al., 2000; TAFURI et al., 2001) ou artificial (TAFURI et al., 1996) foram basicamente hiperplasia e hipertrofia do sistema mononuclear fagocitário. O estudo histopatológico realizado por SANCHEZ e colaboradores (2004), no qual foram comparadas alterações hepáticas e esplênicas em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, demonstrou que havia evidências de respostas imunes distintas entre os órgãos analisados nos achados *post-mortem*. Nesse estudo, os autores descrevem ainda uma desorganização na formação de granulomas no fígado canino, diferente,

portanto, do que foi estabelecido em camundongos, de acordo com os dados reportados por KAYE e colaboradores (2004). Esses achados indicam que conclusões obtidas de estudos em camundongos podem não aplicar-se integralmente aos cães, da mesma forma que ocorre com alguns ensaios vacinais, que produzem resultados distintos no camundongo e no cão (MORENO & ALVAR, 2002).

Portanto, como preparações candidatas a vacinas contra a LVC devem ser testadas obrigatoriamente em cães, é fundamental o conhecimento sobre a resposta imune desta espécie. O domínio do conhecimento sobre a resposta imune do cão, nos órgãos-alvo da infecção, torna-se particularmente importante para assegurar que o futuro desenvolvimento de vacinas, imunoterápicos e quimioterápicos estaria levando em consideração os vários requerimentos para a proteção do hospedeiro.

1.5. Métodos para avaliação da composição celular esplênica aplicáveis ao monitoramento de intervenções terapêuticas e vacinais na leishmaniose visceral canina

Apenas recentemente, com o desenvolvimento de reagentes capazes de identificar moléculas de superfície das células caninas envolvidas na resposta imune (COBBOLD & METCALFE, 1994), vem sendo possível o estudo das bases celulares da modulação da resposta imune nos cães portadores de LV, que apresentam uma intensa resposta de anticorpos e inibição da imunidade celular à infecção, tornando-os refratários ao tratamento (MORENO et al., 1999).

A produção e disponibilização de anticorpos monoclonais específicos para antígenos de superfície de células de cão têm possibilitado o desenvolvimento de estudos voltados para a compreensão dos mecanismos e componentes da imunidade canina (WILLIAMS 1997; REIS et al., 2005). Entretanto, diferentemente do que ocorre com o conhecimento da resposta imune murina e humana, cujo estabelecimento vem sendo auxiliado pela larga disponibilidade de anticorpos comerciais específicos para uma diversidade de moléculas de superfície celular (BYRNE et al., 2000b), muitos dos estudos voltados para a imunidade canina ainda

estão no campo da padronização de técnicas e estabelecimento de parâmetros da normalidade (TIPOLD et al., 1998; BYRNE et al., 2000a; FALDYNA et al., 2001; SAKAI et al., 2003; HOGENESCH et al., 2004; REIS et al., 2005). A limitada disponibilidade de anticorpos específicos para leucócitos de cão tem ocasionado a utilização de anticorpos desenvolvidos para outras espécies, mas que apresentam reatividade cruzada com antígenos de cão (JONES et al., 1993; DARBES et al., 1997; YAMATE et al., 2000; AGUIAR et al., 2004). Constantes esforços de aprimoramento de técnicas de imunofenotipagem são exigidos à medida que novos anticorpos, específicos para o cão, vão sendo desenvolvidos.

A maioria dos dados caracterizando leucócitos de cão, obtidos por meio de técnicas de imunofenotipagem, é concernente a células do sangue periférico (WILLIAMS et al., 1997; BYRNE et al., 2000a, 2000b; CHABANNE et al., 2000; FALDYNA et al., 2001; GREELEY et al., 2001; OTANI et al., 2002; REIS et al., 2005). Alguns autores têm avaliado a presença, distribuição e / ou atividade de subgrupos de leucócitos em outros órgãos e fluidos biológicos, como o fluido cérebro-espinhal (TIPOLD et al., 1998), lavado bronco-alveolar (OUT et al., 2002), fígado (SAKAI et al., 2002), fluido pericárdico (GUGLIELMINO et al., 2004), cérebro (STEIN et al., 2004) e órgãos linfáticos (FALDYNA et al., 2005). As informações adquiridas nesses estudos vêm contribuindo para o conhecimento acerca de componentes da resposta imune canina nos sítios estudados.

Dadas as funções do baço, como órgão linfóide secundário, incluindo fagocitose, imuno-regulação, resposta imune a antígenos e hematopoiese, associadas ao seu contato intrínseco com o sangue (CHRISTOPHER, 2003), a avaliação citológica e a caracterização de elementos imunitários desse órgão tornam-se indispensáveis para a compreensão da resposta imune canina em diversas condições patológicas, particularmente aquelas de origem infecciosa e linfoproliferativa. Na LVC, a ocorrência consistente de esplenomegalia (BLAVIER et al., 2001) e o fato do baço albergar e concentrar mais parasitos que outros órgãos linfóides (NATAMI et al., 2000) são indicativos de seu papel importante no curso da infecção. Como tal, o baço torna-se um sítio de interesse para a compreensão dos eventos envolvidos na resistência ou na susceptibilidade do cão na LV, nas diversas fases e condições naturais do processo infeccioso. Até o presente, apenas um

trabalho pioneiro reporta dados de citometria de fluxo para identificação de subpopulações de leucócitos em amostras de baço na LVC (SANCHEZ et al., 2004), contrastando com a abundância observações disponíveis sobre aspectos imunológicos esplênicos na LV murina (KAYE et al., 2004).

A análise citológica do baço, a partir de amostras obtidas por meio de biópsia aspirativa com agulha fina, auxiliada por métodos de coloração convencional, imunocitoquímica e / ou por meio de citometria de fluxo, tem se mostrado factível na análise diagnóstica em uma grande variedade de condições patológicas humanas (HAQUE et al., 1993; ZEPPA et al., 1994, 2003; ZANDER et al., 1994; LISHNER et al., 1996; BONIFACIO et al., 2000; KALEEM et al., 2001). Algumas neoplasias têm sido investigadas, na medicina veterinária, por meio da aplicação de métodos imunocitoquímicos em aspirados esplênicos (CHRISTOPHER, 2003). Entretanto, o potencial diagnóstico e os possíveis benefícios de métodos sistemáticos de análise dos componentes imunológicos do baço canino na LV ainda carecem de atenção. A biópsia aspirativa com agulha fina, realizada no animal vivo, e passível, portanto, de ser repetida seqüencialmente, permitiria uma avaliação da dinâmica da resposta imune esplênica no decorrer de ensaios experimentais com candidatos a imunoterapia e vacina contra LVC. Os dados obtidos poderiam complementar outros estudos realizados em amostras de sangue periférico ou obtidas *post-mortem*. Assim, seria possível a avaliação da evolução da doença ou da resposta ao tratamento em um mesmo animal.

Considerando-se que o cão sofre de uma série de doenças que também ocorrem na espécie humana, como imunodeficiências primárias, autoimunidade e outros distúrbios patológicos de etiologia infecciosa ou neoplásica, envolvendo o sistema imune, métodos padronizados para a avaliação da imunidade esplênica órgão-específica seriam ferramentas úteis em uma série de estudos experimentais e no diagnóstico de rotina na clínica veterinária.

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

É possível desenvolver uma metodologia para obtenção seqüencial e avaliação quantitativa e qualitativa de células do baço, obtidas de aspirados esplênicos, que possa fornecer dados sobre a resposta imune específica desse órgão linfóide, contribuindo assim para o conhecimento da imunologia canina em condições de saúde e na leishmaniose visceral?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar sub-populações celulares no baço do cão na infecção natural por *L. chagasi*, buscando identificar, com um método padronizado, marcadores aplicáveis ao estudo da doença leishmaniose visceral canina *in vivo*, que possam vir a ser úteis em diagnóstico de rotina e em condições experimentais.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Padronizar e adequar um método composto por técnicas de obtenção e processamento de amostras de leucócitos esplênicos de cão, obtidos de aspirados, para estudo citológico, permitindo a avaliação de resposta inflamatória e a quantificação do parasitismo no baço.

3.2.2. Padronizar técnicas imunocitoquímicas para avaliação fenotípica de populações celulares obtidas por aspirados esplênicos no cão, utilizando anticorpos monoclonais.

3.2.3. Aplicar o método na avaliação das amostras de baço em dois grupos distintos de cães de área endêmica para LV, um composto por animais infectados poli-sintomáticos e outro composto por animais não infectados clinicamente saudáveis.

4. JUSTIFICATIVA

O conhecimento da imunologia canina ainda guarda uma longa distância em comparação com as informações atualmente obtidas sobre a imunologia humana e de roedores. Exemplificando, o cão difere de todos os outros animais avaliados com relação à expressão de CD4: o neutrófilo canino, ao contrário do que ocorre com outras espécies, possui uma quantidade alta dessas moléculas (Williams 1997). Existe, além da demanda por reagentes específicos para o cão, a necessidade de testes padronizados para o estudo adequado do sistema imunológico canino, tanto para obtenção de parâmetros da normalidade, quanto na avaliação de condições patológicas. Os benefícios trazidos pelo conhecimento da imunologia canina repercutiriam tanto na rotina clínica da medicina veterinária, quanto na pesquisa básica, uma vez que o cão, além de ser considerado um modelo para estudo de doenças que acometem seres humanos, participa em ciclos de importantes infecções zoonóticas, como a LV. Para o desenvolvimento de vacina e/ou imunoterapia eficaz contra a LVC que impeçam a transmissão da *Leishmania* do cão para o flebótomo, é fundamental o conhecimento do sistema imune canino e a disponibilização de ferramentas que permitam seu estudo. Estudos feitos em modelos murinos mostram a importância dos eventos imunológicos que ocorrem no baço, determinando o curso da infecção por parasitos do complexo *Leishmania donovani*. As alterações descritas nesses modelos assemelham-se às descritas em estudos histopatológicos e imunológicos da LVC causada tanto pela *L. infantum*, quanto pela *L. chagasi*, sugerindo que também no cão o baço tem um papel determinante no desenvolvimento de respostas imunes associadas a resistência ou susceptibilidade e, conseqüentemente, na evolução da infecção.

A possibilidade de se proceder a avaliações do baço para diagnóstico de alterações linfoproliferativas de caráter infeccioso ou não tem sido explorada tanto na medicina humana quanto veterinária. Técnicas de estudo citológico têm sido aprimoradas pelo desenvolvimento de testes e reagentes imunológicos, aumentando sua capacidade informativa. Por outro lado, a punção esplênica com agulha fina para obtenção de amostras é uma técnica que, aliada ao desenvolvimento de métodos adequados de análise citológica, pode permitir a obtenção de dados sobre elementos celulares importantes da resposta imune no baço do cão. A punção

esplênica, por poder ser realizada repetidamente em um mesmo animal, seria útil no monitoramento da resposta imune em ensaios com candidatos a vacina e em intervenções terapêuticas experimentais na LVC. Ainda, a punção esplênica seria, em uma grande maioria dos casos, uma alternativa ao sacrifício de animais experimentais para exame do baço. O método poderia, portanto, também aplicar-se ao estudo do sistema imune no baço em várias condições patológicas, possibilitando a obtenção de dados sobre elementos e mecanismos envolvidos na resposta imune canina em diferentes situações.

O baço foi escolhido como alvo deste estudo, e não a medula óssea, por ser a punção desta última um procedimento doloroso, já que a agulha atravessa o perióstio, requerendo procedimentos anestésicos mais cuidadosos, arriscados e dispendiosos, e tornando o procedimento menos indicado para uso extensivo na rotina diagnóstica de parasitismo e para avaliação do sistema imune canino na LV, em medicina veterinária.

5. METODOLOGIA GERAL

5.1. Animais e área endêmica estudada

Todos os cães naturalmente infectados por *Leishmania* examinados neste estudo eram domiciliados em áreas urbanas e peri-urbanas situadas no Litoral Norte do Estado da Bahia, ao longo da Estrada do Coco e da Linha Verde, onde a leishmaniose visceral é endêmica e casos humanos são anualmente notificados. Os locais incluídos foram os municípios de Lauro de Freiras, Camaçari, Mata de São João e Dias D'Ávila e os vários distritos a eles ligados.

Foram incluídos no estudo animais considerados não-infectados, quando apresentavam saúde clínica, soronegatividade para anticorpos anti-*Leishmania* e diagnóstico parasitológico negativo de aspirados esplênicos, provenientes da área endêmica ou não.

Os cães saudáveis não-infectados, usados para obtenção de amostras para utilização como controle negativo e na padronização dos métodos citológicos eram mantidos no canil do CPqGM, FIOCRUZ, Salvador, sob supervisão médico-veterinária.

5.2. Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram realizados nos animais de acordo com as normas definidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Bahia.

5.3. Obtenção de dados clínicos

Os dados clínicos de todos os animais estudados foram obtidos por meio de anamnese e exame físico, e individualmente catalogados em fichas clínicas padronizadas.

5.4. Obtenção de amostras biológicas

Amostras de sangue periférico foram obtidas de todos os animais, com seringas e agulhas descartáveis, das veias cefálica ou jugular, e mantidas em tubos com ou sem anticoagulante (EDTA), no gelo, até processamento em laboratório para separação de soro ou plasma.

Amostras de aspirado esplênico e do linfonodo poplíteo foram obtidas sob sedação com 0,5 mg / kg de acepromazina, com seringas e agulhas descartáveis, e mantidas em gelo até processamento em laboratório para cultivo para diagnóstico parasitológico de LVC e ensaios citológicos (páginas 22 e 29).

5.5. Técnicas Utilizadas

5.4.1. ELISA indireto para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2 específicos para antígenos de *Leishmania* (páginas 29 e 45).

5.5.1. Cultivo de aspirados de baço e linfonodo em meio bifásico para diagnóstico de *Leishmania* (páginas 23, 30 e 46)

5.5.3. Purificação dos leucócitos esplênicos e do sangue periférico (Apêndice 1)

5.5.4. Citocentrifugação em lâmina (Apêndice 2)

5.5.5. Coloração pelos corantes de Wright e hematoxilina-eosina (Apêndice 3)

5.5.6. Imunofluorescência (Apêndice 4)

5.4.3. Imunoperoxidase (Apêndice 5)

5.6. Análise dos Dados

Foi utilizado o teste da probabilidade exata de Fischer para comparação de frequências de ocorrências. O teste *t* de Student foi utilizado para análise de dados com distribuição normal. As análises estatísticas e a determinação do tipo de distribuição (normal ou não) foram feitas com o uso do programa GraphPad (Prism® Software Inc.).

5.7. Composição da Equipe de Trabalho

O estudo foi realizado por uma equipe multidisciplinar, composta por profissionais graduados e pós-graduados em medicina veterinária, medicina, biologia e farmácia, e por alunos de pós-graduação e graduação nessas diversas áreas.

6. PUBLICAÇÕES E MANUSCRITOS

6.1. Publicação:

“Comparison Between Splenic and Lymph Node Aspirations as Sampling Methods for the Parasitological Detection of *Leishmania chagasi* Infection in Dogs.”, por Barrouin-Melo e colaboradores, publicado no periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, volume 99, número 2, páginas 195 -197, 2004. (ISSN: 0074-0276)

Hipótese: O baço seria um órgão-alvo mais adequado que os linfonodos para obtenção de amostras que permitissem uma maior sensibilidade no cultivo em meio bifásico, para o diagnóstico parasitológico da infecção por *L. chagasi*.

A publicação reporta os resultados de um estudo comparativo de aspirados esplênicos e de linfonodo para diagnóstico parasitológico por cultivo, feito em cães suspeitos de infecção por *Leishmania* em uma área endêmica para LV. Essa área, onde há uma alta prevalência de casos caninos e ocorrência de alguns casos humanos, está localizada no Litoral Norte do Estado da Bahia, abrangendo as regiões urbanas e periurbanas dos Municípios de Lauro de Freitas, Camaçari, Dias D'Ávila e Mata de São João, e inclui o Distrito de Monte Gordo, um dos focos onde há maior incidência de casos caninos da região. Pelo menos cinco isolados de parasito de cães, obtidos em focos distintos nessa área, foram caracterizados como sendo *L. chagasi* pelo método isoenzimático por eletroforese, por comparação com uma cepa de referência (LTCC - *Leishmania* Typing Culture Collection - WDCM731), pelo Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose, no Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Os animais estudados foram selecionados pelos critérios: (a) soropositividade para anticorpos anti-*Leishmania*, identificada em testes aplicados por serviços governamentais de controle de zoonoses da região, e/ou (b) co-habitação com animais soropositivos ou com infecção comprovada por diagnóstico parasitológico de LVC, e/ou (c) apresentação de quadro clínico compatível com LVC.

Foram examinados 64 animais, todos submetidos a biópsias esplênica e do linfonodo poplíteo com agulha fina, sob sedação, sendo tomadas todas as precauções e medidas antissépticas prévias, no transcurso e após os procedimentos de coleta de amostras. O material foi inoculado em meio bifásico NNN – Schneider's em condições de esterilidade, e cultivado por no mínimo seis semanas à temperatura de 24° C. Amostras das culturas foram observadas semanalmente por microscopia óptica e o diagnóstico parasitológico positivo feito pela visualização de formas promastigotas do parasito, apresentando movimentação ativa.

Os resultados do estudo mostraram que as amostras de aspirado esplênico permitiram uma sensibilidade significativamente maior que as amostras de aspirado de linfonodo no diagnóstico parasitológico da LV, após procedimentos de coleta e cultivo feitos sob as mesmas condições. Assim, pelo menos nas nossas condições geográficas, o baço seria o órgão ao qual deve ser dada preferência para a obtenção de uma amostra biológica adequada ao diagnóstico confirmatório da infecção no cão.

Esses resultados apontam uma possibilidade a ser mais detalhadamente investigada: a de que cepas de *Leishmania* associadas à doença visceral canina possam apresentar características biológicas variáveis em diferentes áreas geográficas, como, por exemplo, o tropismo por determinados órgãos no decorrer da evolução da infecção. Tal hipótese surge ao compararmos nossos resultados com uma série de publicações reportando o isolamento de *Leishmania* a partir de aspirados de linfonodo de cão como diagnóstico parasitológico preferencial em outros países, onde a doença é também endêmica. Dado o ineditismo da abordagem feita no nosso estudo, e a escassez de dados semelhantes, provenientes de estudos em outras localidades, podemos também aventar a suposição de que a biópsia esplênica é preterida em relação a aspirados de linfonodo por outros motivos. Uma possibilidade seria o receio, por parte dos profissionais de medicina veterinária, de eventos hemorrágicos possivelmente decorrentes da punção esplênica, ou da indução acidental de infecção no próprio baço ou estruturas adjacentes. Ainda, a facilidade anatômica de acesso ao linfonodo para execução de punção aspirativa poderia ser outro fator a influenciar sua escolha como órgão para amostragem. Considerando que tais considerações estariam

direcionando a seleção do órgão-alvo na realização de coleta de amostras para diagnóstico parasitológico da LVC, em uma série de estudos, sem levar em conta seu potencial diagnóstico por excelência, possíveis conclusões acerca de incidência e intensidade de parasitismo, em animais soropositivos, poderiam estar equivocadas. De fato, há publicações reportando resultados de análises histopatológicas *post-mortem*, que demonstram ser o baço mais amplamente parasitado do que linfonodos em cães infectados por *L. infantum* e *L. chagasi* (TRYPHONAS et al., 1977; NATAMI et al., 2000; SANCHEZ et al., 2004).

A grande importância de um diagnóstico parasitológico sensível advém de fatores como a possibilidade de resultados de falsa positividade e falsa negatividade nos diversos testes sorológicos utilizados na rotina de diagnóstico veterinário e em estudos epidemiológicos, tema largamente discutido na literatura mundial. Tal questão é agravada pelo fato de que os programas de controle da doença no Brasil baseiam-se principalmente no sacrifício de animais infectados, cujo diagnóstico é freqüentemente amparado em apenas um exame sorológico, o que resulta em um impacto social negativo, devido ao valor dado ao cão na sociedade humana. Por outro lado, como o cão é considerado o mais importante reservatório da infecção nos ambientes urbanos, torna-se fundamental a acuidade diagnóstica da infecção, evitando-se a permanência de animais soronegativos portadores da infecção, sem que seja providenciada uma solução adequada para evitar a transmissão dos parasitos ao flebótomo nas áreas endêmicas.

O próximo passo seria, portanto, verificar os riscos reais da realização da punção esplênica para obtenção de amostras com o objetivo de realizar pesquisa do parasito como método de diagnóstico confirmatório em cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*, em condições clínicas diversas.

SHORT COMMUNICATION

Comparison between Splenic and Lymph Node Aspirations as Sampling Methods for the Parasitological Detection of *Leishmania chagasi* Infection in Dogs

Stella Maria Barrouin-Melo/*/+ , Daniela Farias Lorangeira, Joelma Trigo* ,
Paulo Henrique Palis Aguiar/* , Washington Luís Conrado dos-Santos/** ,
Lain Pontes-de-Carvalho/**

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz, Rua Valdemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, BA, Brasil *Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil **Escola Bahiana de Medicina, Fundação para o Desenvolvimento das Ciências, Salvador, BA, Brasil

The sensitivities of spleen and lymph node cultures for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis were compared in 64 anti-Leishmania antibody positive dogs from an endemic area in Brazil. The sensitivity of spleen cultures for Leishmania detection was 97.9%; in lymph node cultures it was 25%. Positive spleen culture was more frequent ($p = 0.048$, Fisher's exact probability test) in symptomatic (28 out of 33 animals) than in asymptomatic animals (19 out of 31 animals). These results support the use of spleen instead of lymph node aspiration as the choice method for the parasitological diagnosis of the infection.

Key words: *Leishmania chagasi* - dog - diagnosis - Brazil

Zoonotic visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania chagasi/Leishmania infantum* (Herwaldt 1999). The disease is endemic in American, European, and Asiatic countries (Pearson & Sousa 1996, Herwaldt 1999) with new areas of infection dissemination being identified (Enserink 2000, Silva et al. 2001). The fact that dogs are considered the most important urban reservoir of *L. chagasi* makes canine visceral leishmaniasis (CVL) not only a major veterinary concern, but also a so far unsolved public health problem. Accurate diagnosis of canine infection by *Leishmania* is essential in veterinary practice, since the treatment of infected dogs includes 15-20 daily injections of potentially toxic drugs, and in some countries, killing of infected animals is one of the measures applied in order to control the disease dissemination (Costa & Vieira 2001, Moreno & Alvar 2002). Dogs with symptomatic disease have fever, anemia, skin lesions, emaciation, hypergammaglobulinemia, hepato-splenomegaly, and lymphadenomegaly, among other signs of the disease (Feitosa et al. 2000, Moreno & Alvar 2002). The main pathological substrate of visceral leishmaniasis is amastigote multiplication in the mononuclear phagocytic

cells of internal organs such as spleen, liver, and bone marrow (Oliveira et al. 1993). In dogs, parasites are also found in peripheral lymph nodes and skin. The direct examination or cultivation of aspirates from spleen or bone marrow are the mainstay techniques used for the diagnosis of visceral leishmaniasis in both human beings and dogs. In fact, high sensitivity has been attributed to the parasitological diagnosis based on bone marrow or spleen examination in canine (Ashford et al. 1995) and human (Pearson & Sousa 1996, Pintado et al. 2001) visceral leishmaniasis. Some authors, however, have used popliteal lymph node aspiration for parasite demonstration in CVL (Mathis & Deplazes 1995, Ozensoy et al. 1998, Santos-Gomes et al. 2002). The reasons for using lymph node instead of spleen or bone marrow for diagnosis of CVL is the more peripheral location of lymph nodes (such as popliteal lymph node usually used in the procedure) and concerns about safety of the procedures (i.e. a possible risk of internal hemorrhage following spleen or liver puncture). However, no studies, to the best of our knowledge, have comparatively assessed the advantages and limitations of lymph node over internal organ examinations for the diagnosis of CVL.

In order to perform aspirative biopsies from lymph node or spleen, slight sedation must be induced in the animal, using pre-anesthetic drugs. Both procedures require technical training that do not involve different levels of difficulty. The main risks that can be anticipated for these procedures are spleen hemorrhage and popliteal neurovascular plexus lesion. In our group's practice, however, after more than 300 spleen puncture and more than 100 lymph node puncture, none of these intercurrents was observed, and only slight signs of discomfort were observed during lymph node puncture under sedation.

Financial support: Fundação Oswaldo Cruz (Papes II, grant 250.250.320) and Ministry of Science and Technology, Brazil (Brazilian National Research Council, CNPq, grant 52629/96-5 and Pronex)

*Corresponding author. Fax: +55-71-356.3911. E-mail: sbarrouin@cpqgm.fiocruz.br
Received 30 September 2003
Accepted 6 February 2004

In this study, the sensitivities of splenic and popliteal lymph node cultures for diagnosis of CVL were compared. We examined 64 dogs from Monte Gordo, an endemic area for visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. These animals varied in age (from 4 months to 9 years), sex (38 male, 26 female) and breed. All dogs had positive serological tests (ELISA or IF) for anti-*Leishmania* antibodies. Thirty one animals were asymptomatic, 26 had a few clinical signs of disease (oligosymptomatic), and 7 had multiple signs of visceral leishmaniasis (polysymptomatic), including emaciation, anemia, skin lesions around the nose, eyes, and on limbs, increase in size of lymph node and spleen and onicogriphosis (Table).

TABLE
Clinical categories and presence of parasite in culture lymph node and spleen aspirates of dogs with natural infection with *Leishmania chagasi*

Clinical category	Spleen	Spleen and lymph node		None	Total
		Lymph node	Spleen and lymph node		
Asymptomatic	16	-	3	12	31
Oligosymptomatic	17	-	5	4	26
Polysymptomatic	3	1	3	-	7
Total	36	1	11	16	64

The animals were tranquilized with an intravenous injection of 0.5 mg/kg of acepromazine and laid down on the right lateral side. Hairs were removed from the skin over the sites of puncture, and asepsis was done with a 2% alcohol-iodine solution. Splenic puncture was done in the left flank, near the edges of the last two ribs, using a 40 x 12 mm needle and a 10 ml syringe. The lymph node aspirates were done in the left popliteal lymph node using a 25 x 8 mm needle and a 10 ml syringe. The spleen and lymph node samples (approximately 100-200 µl) were cultured in a biphasic medium containing 1.5 ml of blood-agar solid medium and 2 ml of Schneider's medium supplemented with 20% of fetal calf serum. Cultures were maintained at 23°C and examined weekly under light microscopy during one month.

As shown in the Table, 16 out of the 64 dogs studied had negative spleen and lymph node cultures for *Leishmania*, 11 (17.2%) had both spleen and lymph node positive cultures, 36 (56.2%) had only spleen culture positive, and 1 (1.6%) had only lymph node positive cultures. Therefore, sensitivity of spleen culture for diagnostic of *L. chagasi* was 73.4% (47/64), and of lymph node culture was 18.8% (12/64), both using serology as reference. Considering only the animals with infection confirmed in culture, the sensitivity of spleen culture for diagnostic of *L. chagasi* was 97.9%, and of lymph node culture was 25%. Positive spleen culture was more frequent ($p = 0.048$, Fisher's exact probability test) in symptomatic (28 out of 33 animals, = 84.8%) than in asymptomatic animals (19 out of 31 animals, = 61.3%). There was no difference in the presence of positive lymph node culture between symptomatic and asymptomatic animals.

The results presented herein support the use of spleen instead of lymph node aspiration as the choice method for parasitological diagnosis of CVL caused by *L. chagasi*. Also, spleen puncture appeared to be better tolerated than the lymph node puncture, even in the most clinically affected dogs, exhibiting severe anemia and caquexia. The anatomic site where the popliteal lymph node is located is rich in nerves and nervous fibers, originated from the lombosacral plexus, which are susceptible to accidental traction and physical trauma during lymph node puncture. This fact may explain the transitory signs of pain demonstrated by most animals.

An interesting aspect of this work is the discrepancy of our findings on the sensitivity of lymph node aspirates with the experience reported by other authors in the literature (Mathis & Deplazes 1995, Reale et al. 1999). Popliteal lymph node culture has been considered as a sensitive method for diagnosis (Mathis & Deplazes 1995) and follow-up (Riera et al. 1999) of dogs with CVL. Reale et al. (1999) and Ozbel et al. (2000), on the other hand, found direct examination more effective than culture for the diagnosis of CVL, using total blood or lymph node aspirate. The low sensitivity of lymph node culture in the diagnosis of CVL observed in the study described herein cannot be attributed to poor parasite growth in culture due to culture conditions, since the sensitivity of spleen cultures performed under similar conditions and using specimens from the same animals was high. Contamination by microorganisms such as fungus or bacteria does not explain also the difference between spleen and lymph node culture sensitivities reported herein, since these cultures remained free of visible contamination for at least three weeks, a sufficient time for promastigote identification even under conditions of low inocula (Buffet et al. 1995). Another factor, which affects the ability to detect *Leishmania* in different tissues, is the host immunological status. *Leishmania* dissemination to unusual sites and high parasite burden are observed in hosts with severe impairment of the immunological response (Alvar et al. 1997). Generally, animals with clinical forms of CVL are in a more advanced stage of the infection and have depression of the cellular immune response to *Leishmania* (Rhalem et al. 1999). No differences in the frequency of positive lymph node culture between polysymptomatic animals and those with less severe disease, however, were observed in the present work. Finally, actual difference may exist in the tissue distribution of *L. chagasi* to the spleen and lymph node. Some studies reporting high sensitivity of lymph node examination for diagnosis of CVL were produced in Europe, where *L. infantum* is the infecting agent (Mathis & Deplazes 1995, Reale et al. 1999). Evidences exist that *L. chagasi* and *L. infantum* are the same *Leishmania* species (Mauricio et al. 2002), probably introduced into the American Continent during European colonization. Hence, one of the possible explanations for the discrepancy between our data and that presented by those authors reporting high sensitivity of lymph node aspiration is the existence of variations in the *Leishmania* strains causing CVL in the Old and in the New World. In fact, the ability for disseminating and causing lesions at different sites such as skin and internal organs varies

with the zymodeme expressed by different strains of *L. infantum* (Alvar et al. 1997, Sulahian et al. 1997). Similarly, and not yet well understood, differences in parasite distribution are also observed with strains of *L. chagasi* (Noyes et al. 1997). Further studies are necessary in order to identify the factors responsible for the putative differences in the ability of *L. chagasi*/*L. infantum* strains to disseminate to lymph nodes and also the molecular mechanisms involved in *Leishmania* tropism to different tissues.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr Moacir Paranhos Silva (Institute of Health Sciences, UFBA), for his technical assistance on splenic punctures.

REFERENCES

- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10: 298-319.
- Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker Jr RH 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53: 251-255.
- Buffet PA, Sulahian A, Garin YJ, Nassar N, Derouin F 1995. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2167-2168.
- Costa CH, Vieira JB 2001. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 223-228.
- Enserink M 2000. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 290: 1881-1883.
- Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV 2000. Clinical aspects from dogs naturally infected with visceral leishmaniasis in Araçatuba, São Paulo State, Brazil. *Clinica Veterinária* 28: 36-44.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.
- Mathis A, Deplazes P 1995. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol* 33: 1145-1149.
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16: 188-189.
- Moreno J, Alvar J 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18: 399-405.
- Noyes H, Chance M, Ponce C, Ponce E, Maingon R 1997. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Exp Parasitol* 85: 264-273.
- Oliveira GGS, Santoro F, Sadigursky M 1993. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 243-248.
- Ozbel Y, Oskam L, Ozensoy S, Turgay N, Alkan MZ, Jaffe CL, Ozcel MA 2000. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop* 74: 1-6.
- Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG, Ozcel MA 1998. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 59: 363-369.
- Pearson RD, Sousa AQ 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 22: 1-13.
- Pintado V, Lopez-Velez R 2001. Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19: 353-357.
- Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol* 37: 2931-2935.
- Rhalem A, Sahibi H, Guessouss-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B 1999. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 81: 173-184.
- Riera C, Valladares JE, Gallego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, Ribas N, Carrio J, Alberola J, Arboix M 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 84: 33-47.
- Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 88: 21-30.
- Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Friúza VO, Brazil RP 2001. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 285-291.
- Sulahian A, Garin YJ, Pralong F, Dedet JP, Derouin F 1997. Experimental pathogenicity of viscerotropic and dermatropic isolates of *Leishmania infantum* from immunocompromised and immunocompetent patients in a murine model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 17: 131-138.

6.2. Publicação:

“Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals”, por Barrouin-Melo e colaboradores, aceito para publicação pelo periódico The Veterinary Journal. No prelo, 2005. (ISSN: 1090-0233)

Hipótese: A punção esplênica para obtenção de amostras por aspiração com agulha fina seria uma técnica segura em cães suspeitos de serem portadores de LV, inclusive naqueles com doença clínica evidente.

Esta publicação descreve um estudo feito em 209 animais com suspeita clínica de infecção por *L. chagasi*, com o propósito de avaliar a segurança da punção aspirativa com agulha fina, para obtenção de amostras de baço, a serem utilizadas em análises laboratoriais. Como amostras obtidas por punção esplênica permitiram maior sensibilidade no diagnóstico parasitológico da infecção do que aspirados de linfonodo, conforme demonstrado na publicação anterior, a pergunta agora seria se animais infectados, particularmente aqueles com doença clínica avançada e / ou doenças concomitantes, poderiam ser submetidos ao procedimento. Ainda, se a punção esplênica apresentaria riscos e qual seria a probabilidade de intercorrências, mesmo em animais clinicamente saudáveis, infectados ou não por *Leishmania*.

Assim, animais domiciliados em uma área endêmica para LV (Litoral Norte do Estado da Bahia), apresentando sorologia positiva, quadro clínico compatível com leishmaniose visceral e / ou co-habitação com animais com infecção comprovada por exames parasitológicos, foram submetidos à biópsia esplênica por aspiração com agulha fina. Os animais foram avaliados clinicamente por ocasião da realização das punções, sendo seus dados individuais obtidos por meio de anamnese e exame físico; amostras de sangue foram simultaneamente coletadas para verificação da resposta vigente de anticorpos a antígenos de *Leishmania* no momento da punção. Parâmetros fisiológicos dos animais foram observados durante e depois da

realização do procedimento, por até oito dias, com atenção particular em possíveis evidências de hemorragia ou infecção.

Embora o grupo de cães fosse composto por animais com grande variação de aspectos como idade, sexo e tamanho corporal, e, principalmente, com quadro clínico variando de soronegatividade, com ausência de sinais, até o estado terminal de doença, os procedimentos de punção esplênica foram bem sucedidos, não sendo observadas complicações clinicamente relevantes. Cabe ressaltar que 85% dos animais apresentavam alterações clínicas com graus variados de intensidade. A avaliação clínica do grupo mostrou que os sinais apresentados pelos cães infectados seguem o perfil comumente descrito para a LVC nas diferentes áreas endêmicas mundiais. Esse fato pode significar que o espectro clínico de doença visceral canina, associado à infecção pelos parasitos do complexo *Leishmania donovani*, pode não apresentar grandes variações decorrentes de possíveis diferenças genéticas entre cepas geograficamente separadas. Um aspecto relevante desse estudo é que 22% dentre os animais apresentavam evidências clínicas de sangramento espontâneo por orifícios naturais ou petéquias em pele e mucosas, assim como histórico de infecção por *Ehrlichia sp*, cuja patogenia está associada a trombocitopenia e distúrbios de coagulação. Tais distúrbios poderiam consistir em fatores predisponentes a acidentes hemorrágicos durante ou após o procedimento de punção esplênica. Da mesma forma, os animais mais acometidos de sinais clínicos, tanto quantitativa quanto qualitativamente, poderiam ser mais propensos à ocorrência de efeitos colaterais na punção esplênica. Não houve, entretanto, efeitos indesejáveis, associados às punções, que pudessem comprometer clinicamente os animais, mesmo nos grupos de cães, a princípio, de maior risco. Foi possível isolar parasitos em 83% dos animais soropositivos e em 26% dos animais soronegativos para anticorpos anti-*Leishmania*.

Dessa forma, concluímos que a punção esplênica é uma técnica segura, e que, além de ser um método que permite um grau satisfatório de sensibilidade no diagnóstico parasitológico definitivo da LV, fornece amostras de baço dos animais, mesmo aqueles mais comprometidos em sua saúde, úteis para análise em laboratório.

Available online at www.sciencedirect.com

The Veterinary Journal xxx (2005) xxx–xxx

The
Veterinary Journal
www.elsevier.com/locate/tvj

Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals

Stella Maria Barrouin-Melo ^{a,b,c,*}, Daniela Farias Larangeira ^a,
 Fernando Antônio de Andrade Filho ^c, Joelma Trigo ^d, Fred Silva Julião ^c,
 Carlos Roberto Franke ^c, Paulo Henrique Palis Aguiar ^{a,b,c},
 Washington Luís Conrado dos-Santos ^{a,e}, Lain Pontes-de-Carvalho ^{a,e}

^a Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Valdemar Falcão 121, Salvador 40295-001, Brazil

^b Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Salvador 40170-000, Brazil

^c Laboratório de Infectologia Veterinária, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Salvador 40170-000, Brazil

^d Laboratório de Doenças Tropicais, Hospital Universitário Prof. Edgar Santos, Rua João das Botas s/n, Salvador 40110-060, Brazil

^e Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Fundação para o Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Brazil

Accepted 5 November 2004

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the safety of spleen aspiration as a sampling technique for the parasitological detection by culture and microscopy of *Leishmania (chagasi) infantum*. Two hundred and nine domiciled dogs from an endemic area for visceral leishmaniosis in Bahia State, Brazil, were studied.

Most dogs (87%) were seropositive for anti-*L. chagasi* antibodies by ELISA. Clinical signs of disease were recorded and the animals monitored during and after spleen puncture in order to detect possible complications associated with the procedure. From a total of 257 splenic punctures in the 209 animals, only three minor events occurred, with no significant consequence for the animals and no association with risk factors. *Leishmania* was isolated from 149/180 (83%) seropositive dogs, and from 6/26 (23%) seronegative animals. The procedure did not cause adverse side effects or unnecessary suffering and confirmed the diagnosis in a large percentage of dogs. We conclude that spleen aspiration can be considered an effective and safe procedure for the definitive diagnosis of canine visceral leishmaniosis.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Dog; Leishmaniosis; Parasitological diagnosis; Spleen aspiration; Leishmaniasis

1. Introduction

Dogs are considered the main reservoir of *Leishmania (chagasi) infantum*, the causative agent of zoonotic visceral leishmaniosis (Deane, 1961; Travi et al., 2001; Dereure et al., 2003), a disease of major public health importance in the Old and the New World (WHO,

* Corresponding author. Tel.: +55 71 356 4320 ext 257; fax: +55 71 356 3911.

E-mail addresses: sbarrouin@cpqgm.fiocruz.br, barrouin@ufba.br (S.M. Barrouin-Melo).

ARTICLE IN PRESS

2

S.M. Barrouin-Melo et al. / The Veterinary Journal xxx (2005) xxx–xxx

1990; Paranhos-Silva et al., 1998). Even in India and East Africa, where the infection is considered to be anthroponotic, dogs have been studied in an attempt to clarify the epidemiological mechanisms of dissemination of the parasite (Dereure et al., 2003).

The culling of infected animals (Borja-Cabrera et al., 2004), or their controversial treatment with antimonial drugs, are included among measures believed to control the disease (Vexenat et al., 1998). An accurate diagnostic protocol must therefore be carefully pursued by veterinarians before assigning a definitive diagnosis to a suspected or asymptomatic case.

Infected dogs can be asymptomatic, either at the beginning of the infection (Iniesta et al., 2002) or associated with an efficient Th1-type immunoinflammatory response (Pozio et al., 1981; Abranches et al., 1991; Cabral et al., 1992; Pinelli et al., 1994, 1995). In overt cases, the animals develop canine visceral leishmaniosis (CVL), a severe and progressive disease associated with a Th2-biased, predominantly humoral immune response (Pinelli et al., 1994), which is incapable of containing the spread of the infection in the host organism (Ferrer et al., 1995).

The diagnosis of CVL is hindered by the range of clinical features usually associated with the disease, which is non-specific and includes a broad spectrum of presentations (Ferrer et al., 1995; Blavier et al., 2001). The usual clinical signs reported include cutaneous, periocular and ocular lesions; nephropathy and its consequences; musculoskeletal, cardiovascular, digestive, and respiratory dysfunctions; hypertrophy of the lymphoid organs and haematic disorders (Ferrer et al., 1988; Slappendel, 1988; Ciaramella et al., 1997; Peña et al., 2000; Blavier et al., 2001; Tafuri et al., 2001; Travi et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2004). These latter signs are associated with bone marrow suppressive factors (De Luna et al., 2000), liver and kidney inflammatory injury (Ciaramella et al., 2004), hypergammaglobulinaemia and vascular damage, and are characterised by anaemia, thrombocytopenia (Pelagalli et al., 2004) and delayed coagulation time, frequently culminating with bleeding events and, in most advanced illnesses, disseminated intravascular coagulation (Blavier et al., 2001). Moreover, co-infections (Barbosa-De-Deus et al., 2002), such as ehrlichiosis, which shares many of the pathological and clinical features of CVL, are frequently observed (Llera et al., 2002).

Given these varied, non-specific clinical signs, laboratory techniques are indispensable for obtaining additional diagnostic data. Several tests have been developed in order to identify canine infection (Blavier et al., 2001; Iniesta et al., 2002), of which serological immunoassays are the most common procedures used to complement clinical data on CVL, or to identify *Leishmania*'s antigen-seroreactive animals for epidemiological and control purposes (Iniesta et al., 2002). These

tests are based on the detection of anti-*Leishmania* antibodies by immunofluorescence (Lanotte et al., 1975; Llera et al., 2002), ELISA (Paranhos-Silva et al., 1996; Barbosa-De-Deus et al., 2002), direct agglutination (El-Harith et al., 1989), latex agglutination (Dereure et al., 1998) or immunochromatography (Genaro et al., 1996; Reithinger et al., 2002).

Although most serological techniques are considered fast and practical, their variable sensitivity can result in underestimation of infection (Berrahal et al., 1996), and their poor specificity can lead to false-positive results, due to cross-reaction with other pathogens (Badaró et al., 1983; Barbosa-De-Deus et al., 2002; Iniesta et al., 2002). In addition, it has been demonstrated that some animals remain seronegative for long periods after being infected by *Leishmania* (Killick-Kendrick et al., 1994; Paranhos-Silva et al., 2003).

In places where a positive serological test is enough to justify the culling of a dog, serological failure may cause the sacrifice of unknown numbers of uninfected animals and, on the other hand, leave undetected (and consequently untreated) infected dogs (Moreno and Alvar, 2002), which could probably function as parasite reservoirs with undesirable epidemiological consequences (Dye et al., 1993; Dietze et al., 1997). More sensitive and specific techniques, such as polymerase chain reaction (PCR) (Lachaud et al., 2002), Western blotting (Berrahal et al., 1996; Aisa et al., 1998) and immunohistochemistry (Solano-Gallego et al., 2004) have been applied in research and clinical studies, but have limited routine use in diagnosis in many countries (Guerin et al., 2002). Therefore, classical parasitological methods (parasite demonstration by direct microscopy of organ aspirates and/or culture) are still used in much of the world for producing accurate results and especially to confirm a positive CVL serodiagnosis (Iniesta et al., 2002).

Recently, our research team has shown that, fine-needle spleen aspiration results in a higher frequency of parasite detection, using conventional parasitological techniques, than is obtained with lymph node aspirations (Barrouin-Melo et al., 2004). Such results would probably be improved by using the spleen aspirates for the detection of parasite DNA by PCR (Paranhos-Silva et al., 2003).

The study reported here consists of a careful evaluation of the safety of percutaneous spleen fine-needle aspiration for the diagnosis of CVL. A total of 257 spleen punctures were performed in 209 dogs, which were either asymptomatic or presenting a variety of disease signs, in an endemic area of Brazil. The animals were monitored during the procedure and, in the case of 51 dogs, for the following eight days. The sensitivity of the parasitological diagnosis, as compared with the sensitivity of serology for anti-*Leishmania* antibodies, and its correlation with the clinical profile and physical

ARTICLE IN PRESS

S.M. Barrouin-Melo et al. / *The Veterinary Journal xxx (2005) xxx–xxx*

3

characteristics of the studied canine population are also reported.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The 209 studied animals were from the municipalities of Lauro de Freitas, Camaçari, and Dias D'Ávila, located in the north-east of Bahia State, Brazil, an endemic area for visceral leishmaniosis. Other canine diseases, such as ehrlichiosis, babesiosis and dirofilariasis, share endemicity with CVL in that area. All of the animals were referred to local veterinarians for one or more of the following reasons: they had signs of disease, had been tested seropositive for leishmaniosis by the Municipal Zoonosis Control Services, or lived in the same house as an infected or seropositive animal.

The group of animals was heterogeneous, including mongrel and purebred dogs, of both sexes, with different body sizes and ages varying from six months to 12 years of age. All animals were domiciled and belonged to owners with different socioeconomic conditions.

The procedures we carried out were in accordance with guidelines defined by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the Oswaldo Cruz Foundation, Bahia, Brazil.

2.2. Serodiagnosis

The presence of anti-*Leishmania* antibodies in the sera of all 209 studied dogs was investigated by a classical indirect ELISA, using soluble *L. chagasi* antigens (SLA), as described by Paranhos-Silva and collaborators (1996). The presence of anti-K39 antibodies was assessed, in the sera of the 51 dogs maintained in a veterinary hospital for a short-term follow up, by an indirect ELISA using the K39 recombinant *Leishmania* antigen, as described previously (Badaró et al., 1996). The SLA consisted of the soluble fraction (the supernatant of a 10,000g, 30 min centrifugation) of lysed promastigotes from a local *Leishmania* strain, isolated from a sick dog, and characterised as *L. chagasi* by means of isoenzyme electrophoresis plus comparison with a reference strain (LTCC – *Leishmania* Typing Culture Collection – WDCM731).

All determinations were carried out in triplicate and the mean values above the cut-off were considered to be positive results. The cut-off value was determined by the receiver operating characteristics (ROC) curve, using corrected absorbance values obtained with sera from 30 *L. chagasi*-infected dogs, positive in serological and parasitological tests, and from 71 healthy dogs, living in LCV non-endemic areas (Griner et al., 1981). One dog was serologically tested for ehrlichiosis by a com-

mercial ELISA test kit (SNAP 3Dx, IDEXX Laboratories).

2.3. Clinical evaluation

All dogs were clinically examined for the presence and severity of signs associated with visceral leishmaniosis, such as lesions in the skin and mucous membranes, changes in colour of the mucous membranes, abnormal growth of the claws, ocular and conjunctival disorders, presence of abnormal discharges, weight loss, changes in mental attitude and general disposition, changes in size of lymph nodes and spleen, bleeding events, as well as history and clinical signs of infections other than leishmaniosis, before being subjected to the splenic aspirations.

2.4. Splenic aspiration

The animals were tranquilized with an intravenous injection of 0.5 mg/kg acepromazine and restrained in right lateral recumbency. The hair was removed and asepsis was done on the skin over the site of puncture, with a 2% iodine-alcohol solution. Needles of two gauges were used, 18G × 38 mm or 21G × 32 mm, for dogs above or below 10 kg body weight, respectively, connected to a 10 mL sterile syringe.

The spleen was localised by palpation. During the procedure, the needle was introduced at a ventrally tilted plane, forming a 45° angle with the normal, and a 45° angle with the cranio-caudal line, in the left flank, 1–3 cm (depending on the animal size) from the ventral extremity of the last rib, on a projection of this rib towards the abdominal midline (Fig. 1). After perforating the spleen by introducing about 1–3 cm of needle, according to the dog size, in the animal abdomen, the gentlest negative pressure that allowed the passage of a blood-like, thick material into the syringe was made by pulling manually the syringe's piston. The whole aspiration procedure usually took a few seconds, and yielded samples of approximately 100–200 µL. The material was kept inside the syringes, on ice, until being seeded into culture medium, in the laboratory.

Sixteen animals were subjected to more than one spleen puncture, with intervals that varied from one to three months: six animals were subjected to two punctures because the first aspirate was contaminated by fungus; one animal was subjected to three punctures and nine animals to five punctures in a study aimed at investigating the effect of short-term chemotherapy on spleen parasitism (unpublished data).

2.5. Follow-up of animals after spleen aspiration

The main complications that could happen during or after spleen puncture were: (a) intracavity abdominal

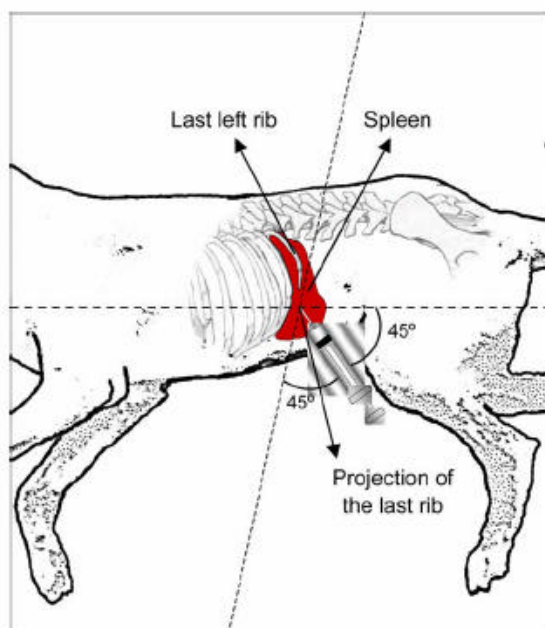


Fig. 1. Angle of introduction, direction and position of the needle for spleen aspiration in most dogs. The position on the projection of the last rib may vary from 1 to 3 cm of the rib extremity, depending on the animal's size.

haemorrhage due to laceration of the spleen, or formation of large haematomas; or (b) skin, subcutaneous, peritoneal, visceral or systemic infection, including abscess formation.

The animals were monitored by clinical evaluation, with assessment of physiological parameters (cardiac, pulse and respiratory frequencies, body temperature, colour and moistness of mucous membranes and capillary refill time), behaviour and facial expression. Particular attention was given to possible evidence of acute blood loss (e.g., tachycardia, lethargy, weak femoral pulses, pale mucous membranes, slow capillary refill time, abdominal distension) or of chronic bleeding/haematoma formation, especially progressive changes in overall demeanour and jaundice.

Investigation of potential signs of infection focused on the presence of fever, abdominal pain or distension and physiological malfunctions. Aggressive or submissive postures, loss of greeting behaviour, withdrawal from or lack of interest in the surrounding environment, depression, stupor, agitation, restlessness, anorexia, insomnia, changes in grooming or elimination habits, altered facial expression and vocalisation were considered as pain signs. Additional clinical evidence of blood loss or infections included tachypnoea, mydriasis, salivation, oedema, sensitivity to palpation or manipulation, areas of hyperalgesia or allodynia and alteration of body posture.

The animals were kept under observation immediately after spleen puncture and until complete recovery from sedation, which usually lasted from 30 to 60 min. Fifty-one dogs, subjected to splenic aspirations in a veterinary hospital, were kept in individual cages in the hospital's premises for eight days after spleen puncture, and were examined daily in accordance with the parameters listed above. The remaining 158 dogs were subjected to splenic aspiration under field conditions in their homes. In the case of these dogs, a new clinical evaluation was carried out on the eighth day after the procedure, and information on possible complications in this eight-day period was obtained by daily phone contact with the owner. Reports or findings of any abnormality would entail an immediate thorough clinical re-examination of the animal, including laboratory tests, such as blood counts, serum biochemistry, or other diagnostic procedures, such as abdominocentesis, radiographic and ultrasonographic evaluation.

2.6. Examination and culture of splenic aspirates

The spleen aspirates were cultured in a biphasic medium containing 1.5 mL of blood-agar solid medium and 2 mL of Schneider's medium (Sigma Chemical Co.) supplemented with 20% of fetal bovine serum (Gibco, BRL). Cultures were maintained at 23 °C and examined weekly under light microscopy for one month. The presence of live, active promastigote forms was considered to be a positive result. The direct microscopic examination of spleen aspirates was not performed in most animals in order to minimise the manipulation of aspirates, which could possibly result in fungal or bacterial contamination of the cultures. When the aspirates macroscopically differed from the usual, blood-like aspect of a splenic aspirate, however, they were examined under optical microscopy to investigate their nature.

2.7. Statistical analysis

The significance of the differences observed between groups was tested by Fisher's exact probability test for cross tables using proportions (Glantz, 2001). In all tests the accepted level of significance corresponded to $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Clinical profile of the animals

Clinical signs of disease were present in 177/209 (84.7%) dogs (Table 1). They included cutaneous changes (alopecia, depigmentation, exfoliation, nodules ulceration and/or pustule formation); onychogryphosis; mucous membrane colour changes (paleness,

ARTICLE IN PRESS

S.M. Barrouin-Melo et al. / The Veterinary Journal xxx (2005) xxx-xxx

5

Table 1
Clinical and physical characteristics of a canine population suspected of having visceral leishmaniasis in an endemic area of Bahia, Brazil, and the presence of *Leishmania* in splenic aspirates

Characteristics	Number of dogs with characteristics/total number of dogs with recorded data (%)	Spleen parasitism	
		Positive cultures (%)	Negative cultures (%)
Gender			
Male	94/155 ^A (61)	66 (70)	28 (30)
Female	61/155 (39)	43 (70)	18 (30)
Age			
≤1 years	10/155 (6)	9 (90)	1 (10)
>1 to ≤6 years	119/155 (77)	84 (71)	35 (29)
> 6 years	26/155 (17)	16 (62)	10 (38)
Body size			
Small	16/155 (10)	10 (63)	6 (37)
Medium	38/155 (24)	26 (68)	12 (32)
Large	104/155 (66)	73 (72)	28 (28)
Clinical findings			
Any clinical sign	175/206 (85)	140 (80) ^a	35 (20) ^a
No clinical sign	31/206 (15)	15 (49)	16 (51)
Previous bleeding	7/155 (4)	7 (100)	0 (0)
Skin lesions	120/155 (77)	90 (75) ^b	30 (25) ^b
Mucous membrane lesions	39/155 (25)	36 (92) ^c	3 (8) ^c
Ocular changes	28/155 (19)	24 (86) ^d	4 (14) ^d
Splénomegaly	150/206 (73)	121 (81) ^e	29 (19) ^e
Normal lymph nodes	28/109 (26)	16 (57)	12 (43)
Reduced lymph nodes	3/109 (3)	3 (100)	0 (0)
Enlarged lymph nodes	78/109 (72)	60 (77)	18 (23)
Cachexia	6/155 (4)	6 (100) ^f	0 (0) ^f
Emaciation	74/155 (47)	58 (78) ^f	16 (22) ^f
Normal weight	73/155 (48)	44 (60) ^f	29 (40) ^f
Overweight	2/155 (1)	1 (50) ^f	1 (50) ^f
Prostration	6/206 (3)	6 (100) ^g	0 (0) ^g
Apathy	38/206 (19)	30 (79) ^g	8 (21) ^g
Normal activity	162/206 (79)	119 (74) ^g	43 (26) ^g
Serology			
Positive	180/206 (87)	149 (83) ^h	31 (17) ^h
Negative	26/206 (13)	6 (23) ^h	20 (77) ^h

^A Numbers ≤ 155 refer to animals studied under field conditions (in their homes); 206 refers to the whole group of studied animals, minus three animals that had contaminated spleen cultures.

^a Fisher exact probability test: $P = 0.0004$.

^b $P = 0.0174$.

^c $P = 0.0002$.

^d $P = 0.0361$.

^e $P = 0.0005$.

^f Cachexia + emaciation vs. regular weight + overweight, $P = 0.0052$.

^g Prostration + apathy vs. normal activity, $P = 0.036$.

^h $P < 0.0001$.

icterus or congestion); mucous membrane nodular or ulcerative lesions, particularly on the lips and nose; ocular disturbances (conjunctivitis, keratitis, keratoconjunctivitis sicca, blepharitis and/or uveitis); weight loss; apathy or prostration; splénomegaly; lymphadenopathy; epistaxis and gingival or abnormal genital bleeding. Furthermore, 35/158 dogs (22.1%) had a history of previous clinical diagnosis and treatment for ehrlichiosis or babesiosis.

3.2. Complication rate during or after fine-needle puncture

After sedation, no animal displayed any evidence of pain or suffering, apart from a few animals that made slight body movements during the needle introduction into the skin. Among the 257 spleen punctures performed in the 209 animals, only three (1.2%) resulted in undesirable events. In two dogs, the macroscopic characteristics of the aspirates were suggestive of intesti-

ARTICLE IN PRESS

6

S.M. Barrouin-Melo et al. / The Veterinary Journal xxx (2005) xxx–xxx

nal material. This was confirmed by microscopic examination, which disclosed the presence of numerous bacteria. These two dogs were kept in hospital for close monitoring, and, since there was never any sign of peritonitis or local infection, no antibiotic or anti-inflammatory therapy was instituted.

None of the 209 studied animals developed any signs of peritonitis or local infection. Another animal, kept under field conditions, developed a 10 cm diameter haematoma in the skin around the point of needle introduction immediately after the procedure, probably due to a vessel injury. This particular animal had *Ehrlichia* infection, as assessed by a serological test. There was no progression of the haemorrhage in this animal. Neither the bowel perforations nor the haematoma formation appeared to be related to size of spleen or previous spontaneous bleeding.

Apart from the haematoma, no other incidents or complications were observed by physical examination performed (1) during the first 30–60 min following spleen aspiration in all dogs, (2) daily during the first eight days after the spleen aspiration in 51 dogs, and (3) on the eighth day after the procedure in all dogs. The physiological parameters of all 209 dogs were within the ranges of normality, as measured during the physical examinations mentioned above.

3.3. Evidence of infection with *Leishmania* and its relationship with clinical findings

Indirect ELISA showed that 87.1% (182/209) of the dogs were seropositive, having a specific humoral response against *L. chagasi* soluble (LCS) or K39 recombinant antigens. The cultures of spleen aspirates from the 209 dogs yielded 155 positive (74.2%), 51 negative (24.4%) and 3 (1.4%) inconclusive results, the latter due to fungal contamination. The distribution of animals in which *Leishmania* was identified in groups of dogs displaying different physical, clinical and serological characteristics, is shown in Table 1. The three animals with inconclusive culture results were excluded from this correlation analysis.

The frequency of splenic parasitism was not influenced by the gender or the body size of the animals. There was no significant difference in the occurrence and distribution of parasitism and the average age of the groups analysed. However, emaciation and cachexia, depression and apathy, cutaneous, mucous membrane and ocular changes, as well as splenomegaly, and positive serology, were significantly more frequent in animals with positive spleen culture. The presence of at least one clinical sign was observed in 90.3% (140/155) of the dogs in the parasite-positive group, and in 68.6% (35/51) of dogs in the negative-parasite group ($P = 0.0004$).

Positive results in anti-*Leishmania* antibody serological tests were not statistically associated with age, body size, gender, and depression/apathy, but were associated with the presence of signs of disease ($P = 0.000081$), including splenomegaly ($P = 0.0008$), skin lesions ($P = 0.0069$), mucous membrane lesions ($P = 0.0006$) and ophthalmic disorders ($P = 0.049$). There was no statistically significant association between spleen parasitism or positive serology and changes in lymph nodes.

The culture carried out with splenic aspirates identified parasites in 149/180 (83%) seropositive dogs, and in 6/26 (23%) seronegative animals.

4. Discussion

This study, together with others carried out by our group (Paranhos-Silva et al., 2003; Barrouin-Melo et al., 2004), show that fine-needle splenic puncture is an effective procedure for the parasitological diagnosis of CVL, yielding adequate samples for the *in vitro* cultivation of parasites. In addition to its efficacy, the technique has been shown to be safe both in hospital premises and in the home as well as in dogs with very different clinical profiles. The procedure was performed in 57 dogs with normal spleen sizes and 152 animals with different degrees of splenomegaly, as determined by palpation, with identical success.

The 209 studied dogs, from a Brazilian area where leishmaniosis is highly endemic, had clinical conditions that varied from asymptomatic, seronegative animals in contact with infected animals (12 dogs), to seriously ill animals (six dogs), displaying a picture of terminal CVL. Moreover, 35 animals had a history or evidence of concurrent infectious diseases, namely ehrlichiosis and babesiosis, and could possibly have had other infections as the studied area also harbours a number of other pathogens such as *Dirofilaria immitis*, *Leptospira* spp. (Paraguassu and Fielder, 1997; Viegas et al., 2001) and intestinal worms.

In fact, the dogs we studied closely reflected the infected population in an endemic area for CVL. Their clinical profile (Table 1) agrees with those seen in other endemic areas (Blavier et al., 2001; França-Silva et al., 2003; Borja-Cabrera et al., 2004). The majority of infected dogs was seropositive, and had more clinical signs, namely cutaneous, mucosal, ocular and periocular lesions, as well as splenomegaly, than parasitologically negative animals. The absence of correlation with some characteristics, such as gender and age, agrees with the reports of Pozio et al. (1981), Abranches et al. (1991) and França-Silva et al. (2003), but disagrees with others (Lanotte et al., 1975; Cardoso et al., 2004), indicating the need for further epidemiological studies.

Fine-needle biopsy of the spleen has been used in the diagnosis of leishmaniosis in human beings (Guerin et

ARTICLE IN PRESS

S.M. Barrouin-Melo et al. / The Veterinary Journal xxx (2005) xxx–xxx

7

al., 2002) and dogs (Strauss-Ayali et al., 2004), as well as in other canine (Stockhaus et al., 1998; Christopher, 2003), feline (O'Keefe and Couto, 1987; Hickford et al., 2000) and human diseases (Kraus et al., 2001; Fritscher-Ravens et al., 2003; Zeppa et al., 2003). Reports focusing on the safety of the procedure, however, are few and concern human patients, utilising, in most cases, ultrasonographic guidance (Bonifacio et al., 2000; Civardi et al., 2001; Lal et al., 2003).

In two previous studies, our team has reported the use of fine-needle spleen aspirations in the diagnosis and follow-up of dogs, either clinically healthy or with patent visceral leishmaniasis, kept under laboratory or in field conditions (Paranhos-Silva et al., 2003; Barrouin-Melo et al., 2004). Some of these animals were subjected to multiple spleen punctures during the course of 13 months without adverse effects related to the procedure (Paranhos-Silva et al., 2003). These studies, however, involved a small number of animals, and safety aspects of the procedure were not their major concern.

Because some animals were punctured more than once, a total of 257 splenic punctures were carried out in the present study in order to obtain a definitive parasitological diagnosis of the infection. Among these 257 procedures, only three adverse incidents occurred: bowel puncture in two animals, and the formation of a skin haematoma at the site of puncture in another. This dog with haematoma lived in an area where ehrlichiosis is prevalent, had fever, depression, enlarged spleen and lymph nodes, and was heavily infested with skin parasites, including ticks, which are known to be *Ehrlichia* vectors. Ehrlichiosis was indeed confirmed by serological test. The animal was therefore infected by both *Leishmania*, which was detected in its spleen aspirate, and *Ehrlichia* and its clinical condition improved after antibiotic therapy for ehrlichiosis. The haematoma formation, which was self-contained, could have been aggravated either by the putative *Ehrlichia* infection and/or by CVL, as both conditions have been associated with bleeding disorders (Slappendel, 1988; Ciaramella et al., 2004).

In the group of dogs we studied, 35 either had overt clinical signs of bleeding disorders or history of ehrlichiosis. Evidence of bleeding abnormalities or anaemia should be one of the major contra-indications for splenic puncture, due to the possibility of internal haemorrhage, as happens with human patients (Guerin et al., 2002; Lal et al., 2003). Fortunately, no evidence of internal haemorrhage was found in the present study. A particularly remarkable finding, however, was the absence of puncture-associated complications even in the animals showing spontaneous bleeding (e.g., epistaxis).

The two dogs that had their bowel accidentally aspirated did not show any complications following the occurrence, during the eight-day follow-up. The other 49 hospital-punctured animals were also closely fol-

lowed for eight days with no abnormality detected. A major concern was peritonitis, abdominal infections and/or septicaemia. Although examination for the presence of bacteria in 207/209 aspirates was not performed, no evidence of local or systemic infections was observed in any of the dogs. Moreover, there was no evidence of any other complication in the 158 dogs that were subjected to splenic puncture under field conditions.

In many countries parasitological methods still offer the most reliable results for the routine confirmation of *L. chagasi* infection in veterinary medicine. It is also probable that the use of spleen aspirates as samples for PCR, would improve the sensitivity of this molecular technique, making the procedure useful in countries where PCR is readily available. Our findings confirm the safety of the technique (a 100% success rate was observed in the 257 aspirations) with no clinically relevant complications. We conclude that splenic aspiration can be indicated as a safe procedure for obtaining live parasites for in vitro cultures for the diagnosis of CVL or to obtain splenic tissue for other tests including PCR assays. However, it should be stressed that a thorough knowledge of canine anatomy and experience in veterinary practice is fundamental for carrying out the technique, which should only be done by a veterinary surgeon.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian National Council for Research and Technological Development (CNPq). We thank Ms. Fabiola Nascimento da Conceição for reviewing the English language.

References

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamin, N., Campino, L., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* 13, 537–550.
- Aisa, M.J., Castillejo, S., Gállego, R., Fisa, R., Riera, M.C., Colmenares, M., Torras, S., Roura, X., Sentis, J., Portús, M., 1998. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58, 154–159.
- Badaró, R., Reed, S.G., Carvalho, E.M., 1983. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32, 480–484.
- Badaró, R., Benson, D., Eulálio, M.C., Freire, M., Cunha, S., Netto, D., Pedral-Sampaio, D., Madureira, C., Burns, J.M., Houghton, J.R., David, J.R., Reed, S.G., 1996. RK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 173, 758–761.
- Barbosa-De-Deus, R., Dos Mares-Guia, M.L., Nunes, A.Z., Costa, R.G., Junqueira, R.G., Mayrink, W., Genaro, O., Tavares, C.A.,

ARTICLE IN PRESS

8

S.M. Barrouin-Melo et al. / The Veterinary Journal xxx (2005) xxx-xxx

2002. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 1361-1366.
- Barrouin-Melo, S.M., Larangeira, D.F., Trigo, J., Aguiar, P.H.P., Dos-Santos, W.L.C., Pontes-de-Carvalho, L., 2004. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 195-197.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., Dunan, S., 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55, 273-277.
- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadore, J.L., Bourdoiseau, G., 2001. Atypical forms of canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal* 162, 108-120.
- Bonifácio, A., Goldberg, R.E., Patterson, B.J., Haider, M., 2000. Flow-cytometry enhanced fine-needle aspiration biopsy of the spleen. *Canadian Association of Radiologists Journal* 51, 158-162.
- Borja-Cabrera, G.P., Cruz-Mendes, A., Paraguai-de-Souza, E., Hashimoto-Okada, L.Y., Trivellato, P.A., Kawasaki, J.K., Costa, A.C., Reis, A.B., Genaro, O., Batista, L.M., Palatnik, M., Palatnik-de-Souza, C.B., 2004. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* 22, 2234-2243.
- Cabral, M., O'Grady, J., Alexander, D., 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology* 14, 531-539.
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G.J., Carreta, P., Varejão, E., van Benthem, B., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Semiao-Santos, S.J., Rodrigues, J., Schallig, H.D., 2004. Seroprevalence study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology* 121, 21-32.
- Christopher, M.M., 2003. Cytology of the spleen. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 33, 135-152.
- Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R.D., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A., 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record* 141, 539-543.
- Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M.E., Corona, M., Lombardi, P., Avallone, L., Persechino, A., 2004. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal*.
- Civardi, G., Vallisa, D., Berte, R., Giorgio, A., Filice, C., Caremani, E., Caturelli, E., Pompili, M., De-Sio, I., Buscarini, E., Cavanna, L., 2001. Ultrasound-guided fine needle biopsy of the spleen: high clinical efficacy and low risk in a multicenter Italian study. *American Journal of Hematology* 67, 93-99.
- Deane, L.M., 1961. Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil. *Revista da Associação Médica Brasileira* 7, 161-169.
- De Luna, R., Ferrante, M., Severino, L., Ambrosio, R., Piantadosi, L., Gradoni, L., Lucisano, A., Persechino, A., 2000. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *Journal of Comparative Pathology* 122, 213-216.
- Dereure, J., Lanotte, G., Pratlong, F., Gouvernet, J., Majhour, J., Belazzoug, S., Khiami, A., Rageh, H.A., Jarry, D., Perieres, J., Rioux, J.A., 1998. Canine leishmaniasis from *Leishmania infantum*: value and production of the latex test. *Ecoepidemiologic applications. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 91, 300-305.
- Dereure, J., El-Safi, S.H., Bucheton, B., Boni, M., Kheir, M.M., Davoust, B., Pratlong, F., Feugier, E., Lambert, M., Dessein, A., Dedet, J.P., 2003. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes and Infection* 5, 1103-1108.
- Dietze, R., Barros, G.B., Teixeira, L., Harris, J., Michelson, K., Falqueto, A., Corey, R., 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical and Infectious Diseases* 25, 1240-1242.
- Dye, C., Vidor, E., Dereure, J., 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting as well as disease. *Epidemiology and Infection* 103, 647-656.
- El-Harith, A., Slappendel, R.J., Reiter, I., van-Knapen, F., de-Korte, E., Huigen, E., Kolk, A.H., 1989. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 2252-2257.
- Ferrer, L., Rabanal, R., Fondevilla, D., Ramos, J.A., Domingo, M., 1988. Skin lesions in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice* 29, 381-388.
- Ferrer, L., Aisa, M.J., Roura, X., Portús, M., 1995. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Records* 136, 514-516.
- França-Silva, J.C., da-Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, C.A., da-Costa, C.A., Mayrink, W., Veira, E.P., Costa, J.S., Genaro, O., Nascimento, E., 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 111, 161-173.
- Fritscher-Ravens, A., Mylonaki, M., Pantas, A., Topalidis, T., Thonke, F., Swain, P., 2003. Endoscopic ultrasound-guided biopsy for the diagnosis of focal lesions of the spleen. *American Journal of Gastroenterology* 98, 1022-1027.
- Genaro, O., Melo, M.A., Costa, R.T., França-Silva, J.C., Arias, J.R., Monteiro, P., Reed, S.G., Badaró, R., 1996. Evaluation of the immunochromatography assay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. A prospective study on experimentally infected dogs with *Leishmania chagasi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 63-70.
- Glantz, S.A., 2001. *Primer of Biostatistics*, fifth ed. McGraw Hill Inc., New York, 545p.
- Griner, P.F., Mayewski, R.J., Mushlin, A.I., Greenland, P., 1981. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. *Annals of Internal Medicine* 94, 555-600.
- Guerin, P.J., Oliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S.L., Desjeux, M.K., Wasunna, M.K., Bryceon, A.D., 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases* 2, 494-501.
- Hickford, F.H., Stokol, T., Vangessel, Y.A., Randolph, J.F., Schermerhorn, T., 2000. Monoclonal immunoglobulin G cryoglobulinemia and multiple myeloma in a domestic shorthair cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, 1029-1033, 1007-1008.
- Iniesta, L., Fernández-Barreto, S., Bulle, B., Gómez, M.T., Piarroux, M., Gállego, M., Alunda, J.M., Portús, M., 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 1137-1141.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Pinelli, E., del-Real, G., Molina, R., Vitutia, R., Canavante, M.M., Nieto, J., 1994. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* 1, 311-318.
- Kraus, M.D., Fleming, M.D., Vonderheide, R.H., 2001. The spleen as a diagnostic specimen: a review of 10 years' experience at two tertiary care institutions. *Cancer* 91, 2001-2009.
- Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Dereure, J., Lamothe, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 125, 197-207.
- Lal, A., Ariga, R., Gattuso, P., Nemcek, A.A., Nayar, R., 2003. Splenic fine needle aspiration and core biopsy. A review of 49 cases. *Acta Cytologica* 47, 951-959.

ARTICLE IN PRESS

S.M. Barrouin-Melo et al. / The Veterinary Journal xxx (2005) xxx–xxx

9

- Lanotte, G., Rioux, J.A., Croset, H., Vollhardt, Y., 1975. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. VIII. Complément à l'application épidémiologique de la technique d'immunofluorescence: les titres géométriques et arithmétiques dans la leishmaniose canine. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 50, 1–5.
- Llera, J.L.G., García, M.L.L., Reinoso, E.M., González, R.V., 2002. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology* 109, 185–190.
- Moreno, J., Alvar, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology* 18, 399–405.
- O'Keefe, D.A., Couto, C.G., 1987. Fine-needle aspiration of the spleen as an aid in the diagnosis of splenomegaly. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1, 102–109.
- Paraguassu, A.A., Fielder, H., 1997. Ocorrência de *Dirofilaria immitis* em cães na cidade de Salvador, Bahia, Brazil. *Arquivos da Escola de Medicina Veterinária UFBA* 2, 99–105.
- Paranhos-Silva, M., Freitas, L.A.R., Dos-Santos, W.L.C., Grimaldi, L., Pontes-de-Carvalho, L., Oliveira-dos-Santos, A.J., 1996. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 39–44.
- Paranhos-Silva, M., Nascimento, E.G., Melro, M.C., Oliveira, W.L.C., Dos-Santos, W.L.C., Pontes-de-Carvalho, L., Oliveira-dos-Santos, A.J., 1998. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis: implications for the disease control. *Acta Tropica* 69, 75–83.
- Paranhos-Silva, M., Oliveira, G.G.S., Reis, E.A., Menezes, R.M.C., Fernandes, O., Sherlock, I., Gomes, R.B.B., Pontes-de-Carvalho, W.L.C., Dos-Santos, W.L.C., 2003. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Veterinary Parasitology* 114, 97–111.
- Pelagalli, A., Ciaramella, P., Lombardi, P., Pero, M.E., Cortese, L., Corona, M., Oliva, G., Avallone, L., 2004. Evaluation of adenosine 5'-diphosphate (ADP)- and collagen-induced platelet aggregation in canine leishmaniasis. *Journal of Comparative Pathology* 130, 124–129.
- Peña, M.T., Roura, X., Davidson, M.G., 2000. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993–1998). *Veterinary Ophthalmology* 3, 35–41.
- Pinelli, E., Kilkick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del Real, G., Ruitenber, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity* 62, 229–235.
- Pinelli, E., Gonzalo, R.M., Boog, C.J., Rutten, V.P., Gebhard, D., Del Real, G., Ruitenber, E.J., 1995. *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* 25, 1594–1600.
- Pozio, E., Gradoni, L., Bettini, S., Gramiccia, M., 1981. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): IV. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Tropica* 38, 383–393.
- Reithinger, R., Quinnell, R., Alexander, B., Davies, C.R., 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2352–2356.
- Slappendel, R.J., 1988. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *The Veterinary Quarterly* 10, 1–16.
- Solano-Gallego, L., Fernandez-Bellon, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., 2004. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of Comparative Pathology* 130, 7–12.
- Stockhaus, C., Slappendel, R.J., Haemophagocytic, C., 1998. Syndrome with disseminated intravascular coagulation in a dog. *Journal of Small Animal Practice* 39, 203–206.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *Journal of Infectious Diseases* 189, 1729–1733.
- Tafari, W.L., de-Oliveira, M.R., Melo, M.N., Tafari, W.L., 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology* 96, 203–212.
- Travi, B.L., Tabares, C.J., Cadena, H., Feroo, C., Osorio, Y., 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64, 119–124.
- Vexenat, J.A., Oliaro, P.L., Fonseca-de-Castro, J.A., Cavalcante, R., Furtado-Campos, J.H., Tavares, J.P., Miles, M.A., 1998. Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with amosidine (paromomycin). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58, 448–453.
- Viegas, S.A., Caldas, E.M., Oliveira, E.E., 2001. Aglutininas anti-Leptospira em hemossoro de animais domésticos de diferentes espécies no Estado da Bahia, Brazil, 1997–1999. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 1, 1–6.
- WHO, 1990. Control of the leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva. Technical Report Series 793.
- Zeppa, P., Picardi, M., Marino, G., Troncone, G., Fulciniti, F., Vetrani, A., Rotoli, B., Palombini, L., 2003. Fine-needle aspiration biopsy and flow cytometry immunophenotyping of lymphoid and myeloproliferative disorders of the spleen. *Cancer* 99, 118–127.

6.3. Manuscrito:

“A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis”, por Barrouin-Melo e colaboradores, aceito para publicação pelo periódico The Veterinary Immunology and Immunopathology, em junho de 2005. (ISSN: 0165-2427) - Ms. No. VETIMM-D-05-00093.

Hipótese: Amostras de baço de cão, obtidas por meio de biópsia aspirativa com agulha fina, ofereceriam de forma consistente material contendo populações de leucócitos esplênicos, passível de análises acerca da resposta imuno-inflamatória órgão-específica na evolução da LV.

Este manuscrito resultou de um estudo desenvolvido para explorar o potencial oferecido pela técnica de biópsia aspirativa com agulha fina em baço de cães, uma vez que as amostras esplênicas assim obtidas mostraram ser as mais adequadas para diagnóstico por métodos parasitológicos, e o procedimento de punção esplênica factível em animais sob diferentes condições clínicas. Mais do que isso, as amostras esplênicas poderiam oferecer um valioso material para estudo de subpopulações leucocitárias, obtidas com segurança do animal vivo, apenas utilizando-se sedação.

A importância da definição e da compreensão de aspectos e componentes da resposta imune órgão-específica no baço do cão decorre de suas funções fisiológicas na resposta imune, do caráter visceralizante da infecção pela *Leishmania* no cão, além de estudos demonstrando seu papel na evolução da infecção para doença clínica ou cura em modelos murinos. É importante salientar que muito pouco se sabe acerca de mecanismos e componentes da resposta imune canina, sobretudo esplênica, uma vez que reagentes específicos para células caninas apenas recentemente vêm sendo disponibilizados.

Assim, nos propusemos a desenvolver métodos que possibilitassem o estudo de células esplênicas de cão, obtidas por meio de biópsia aspirativa com agulha fina. O estudo foi feito em duas etapas, uma de padronização de técnicas de manipulação e preparação das células para análise microscópica, por métodos

químicos e imunoquímicos de coloração, e uma de validação, na qual os métodos foram aplicados em um estudo comparativo de aspirados esplênicos de cães saudáveis ou portadores de LV.

Foram padronizadas as técnicas de processamento dos aspirados esplênicos, nas quais as amostras foram conservadas em meio de cultivo de células com anti-coagulante (heparina), tratadas com tampão de lise de hemácias, lavadas e submetidas a citocentrifugação. As lâminas, contendo os leucócitos esplênicos concentrados e livres de hemácias e debris, foram fixadas com álcool e conservadas a -70°C até serem submetidas às técnicas citoquímicas (coloração por Wright e hematoxilina-eosina) e imunoquímicas, com anticorpos monoclonais (imunoperoxidase e imunofluorescência), para avaliação microscópica e contagem diferencial de populações e subpopulações de leucócitos. Amostras de sangue periférico de cada animal foram também analisadas comparativamente com as mesmas técnicas.

Na etapa de padronização, concluiu-se que as amostras de aspirado esplênico, obtidas de um grupo de cães sadios de uma área não endêmica para leishmaniose, apresentaram um perfil celular diferente do observado em sangue periférico. Além disso, apresentavam elementos ausentes nas amostras de sangue, como fragmentos de estroma esplênico, levando-nos a concluir que a técnica de punção esplênica aspirativa permitia a obtenção de amostras adequadas ao estudo das populações de leucócitos, e conseqüentemente da composição celular da resposta imuno-inflamatória específica do baço.

A aplicação do método padronizado no estudo comparativo entre cães sadios e portadores de LV evidenciou diferenças significativas entre as populações de leucócitos, marcadas tanto com corantes convencionais, como com anticorpos monoclonais, entre os grupos distintos de cães. Esses resultados abrem a perspectiva de que o método seja aplicável particularmente em análises seqüenciais de animais infectados, submetidos a protocolos experimentais de imunoterapia ou em ensaios de avaliação de candidatos a vacina contra a doença. Ainda, o método de purificação e concentração de leucócitos permitiu a facilitação do diagnóstico parasitológico da infecção, por meio da visualização e contagem de células infectadas com formas promastigotas do parasito.

Title: A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis

Names of authors: Stella Maria Barrouin-Melo^{a,b,c,*}, Daniela Farias Lorangeira^a; Silvana Ornelas Santos^c; Adenizar Delgado Chagas-Júnior^c, Mariza Paixão^e; Paulo Henrique Palis Aguiar^{a, b,c}; Washington Luís Conrado dos-Santos^{a,d}, Lain Pontes-de-Carvalho^{a,d}.

Addresses of affiliations :

^a Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Valdemar Falcão 121, Salvador, 40295-001, Brasil;

^b Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Salvador, 40170-000, Brasil;

^c Laboratório de Infectologia Veterinária, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Salvador, 40170-000, Brasil;

^d Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Fundação para o Desenvolvimento das Ciências, Salvador, Brasil.

^e Laboratório Central do Estado da Bahia, Rua Valdemar Falcão 123, Salvador, 40296-710. Brazil.

***Corresponding author:** Stella Maria Barrouin-Melo, e-mail address: barrouin@ufba.br;

Tel.: +55-71-3356-4320 (257); fax: +55-71-3356-3911.

Abstract

A method for the evaluation of splenic cellularity using samples collected by fine-needle aspirative biopsy was standardized in this work. The procedure includes erythrocyte lysing, preparation of cytopsin films, and staining by histochemical and immunocytochemical techniques. The cellular profiles of spleen preparations were compared with those observed in peripheral blood samples subjected to the same procedure. Two groups were compared, one consisting of 14 healthy uninfected and the other of 15 polysymptomatic *Leishmania chagasi* / *infantum*-infected dogs, from an endemic area for visceral leishmaniasis. Cell populations were identified by conventional hematoxylin-eosin and Wright' stainings, and by immunocytochemistry using monoclonal antibodies against canine CD45RA and CD45RB, phagocytes and a pan-leukocyte antigen. As shown by histochemical staining, neutrophil relative counts were lower in the spleen than in the peripheral blood and the reverse was observed for lymphocyte counts in the healthy dog population ($P < 0.05$, t test, for all). Higher neutrophil ($P < 0.0001$) and monocyte / macrophage ($P = 0.0036$) relative counts and lower lymphocyte relative counts ($P < 0.0001$) were found in the spleen of the animals with leishmaniasis, than in healthy animals. The neutrophils to lymphocytes ratios in the spleen samples presented an inversion from healthy (0.4 : 1.0) to *Leishmania*-infected sick dogs (1.5 : 1.0). By immunocytochemical techniques, the spleen of animals with leishmaniasis exhibited higher counts for CD45RB⁺ cells, IH1-positive phagocytes, and pan-leukocyte-positive AB6 cells, and, conversely, lower counts of CD45RA⁺ cells, than in healthy dogs ($P < 0.05$, for all). Additionally, stained cytopsin of infected animals' spleen cells permitted easy identification of amastigote forms of the parasite inside phagocytes, under light microscopy. The methods described herein allowed a clear picture of canine spleen, including the immunological and inflammatory changes that take place in disease. They may, therefore,

constitute a valuable method for the diagnosis and follow-up of infectious, immunomediated, autoimmune or neoplastic diseases, in the veterinary practice and in biological research.

Keywords: Spleen, Canine, Fine-Needle Aspirative Biopsy, Leukocyte Populations, Canine Visceral Leishmaniosis.

1. Introduction

Fine needle spleen aspiration for direct microscopic examination or culture still represents the mainstream confirmative diagnostic test of canine visceral leishmaniosis (CVL) in most countries where the disease is endemic (Iniesta et al., 2002). Changes in lymphoid organs, associated to the proliferation of amastigote forms, are a remarkable element of the clinical and pathological characteristics of CVL (Natami et al., 2000; Tafuri et al., 2001; Lima et al., 2004). Indeed, variable degree of splenomegaly is found in almost every infected dog (Blavier et al., 2001; Barrouin-Melo et al., 2005) and it is believed that the spleen plays a central role in the outcome of the infection (Melby et al., 2001). However, although an association between the early immunological events taking place in the spleen and the development of leishmaniosis has been reported in a murine model (Melby et al., 2001), the same sort of phenomenon needs to be investigated in CVL. In CVL, a dog that develops a cellular immune response, associated to a predominance of IL-12 and IFN- γ , may become asymptomatic or even cured (Abranches et al., 1991; Pinelli et al., 1994, 1995; Deplazes et al., 1995). On the other hand, the animal may develop a severe and progressive disease, associated with the presence of IL-10 and IL-4 and a predominantly humoral immune response (Pinelli et al., 1994), which is incapable of containing the spread of the infection in the host organism (Ferrer et al., 1995; Moreno et al., 1999). In this situation, a wasting disease takes place with a large number of non-specific clinical signs, such as: cutaneous, periocular

and ocular lesions; nephropathy; skeletal muscle, cardiovascular, digestive, and respiratory dysfunctions; lymphoid organ hypertrophy; and haematic disorders (Ferrer et al., 1995; Blavier et al., 2001).

Besides being a reservoir of *Leishmania* parasites in endemic areas (Molina et al., 1999; Guarga et al., 2000), and having great importance as companion animals, dogs are also used in experimental models of human diseases (Faldyna et al., 2005), specially in the study of parasite-host interactions, immune responses, and in the development of new vaccines and therapeutic agents (Williams 1997; Reis et al., 2005).

Despite the great progress in noninvasive imaging techniques and other diagnostic tools, the cytologic investigation of lymphoproliferative alterations provides indispensable information to complement clinical and laboratory data on the evaluation of splenic changes, mostly in the analyses of neoplasia or inflammatory aspects of various illnesses in human (Zeppa et al., 1994; 2003) or veterinary medicine (Christopher 2003). The fine-needle aspirative biopsy of the spleen is a good source of material for those analyses, serving as an alternative to splenectomy or even to the sacrifice of animals for obtaining tissue samples, particularly in experimental conditions. The deployment of monoclonal antibodies reacting against different lymphoid cell types, or against lymphoid cells in different states of activation, has markedly increased the analytical power of the microscopic examination of canine cells and contributed to the understanding of the dog immune system (Cobbold & Metcalfe, 1994; Faldyna et al., 2005).

In the study described below, splenocytes from healthy dogs, and from animals with visceral leishmaniasis (VL), were evaluated by means of chemical and immunochemical techniques, in order to provide: (a) the standardization of a practical and simple evaluation tool for splenic alterations, and (b) information on splenic cell alterations in the active form of the disease. Fine needle aspirations, as performed in this work reported herein, can allow

repeated (Barrouin-Melo et al., 2005) evaluations of splenic changes in dogs, contrasting with the surgical or necropsy procedures used in most reports on the pathological alterations of CVL. To these authors' best knowledge, a standardized method for the sequential analytical study of canine spleen samples, and its application to the study of CVL, as described herein, have not been reported elsewhere.

2. Material and methods

2.1. Animals and experimental design

The standardization of morphological and immunochemical identifications of leukocyte populations in spleen aspirates was carried out in material collected from six healthy mixed bred young adult dogs (three males and three females). They were maintained in a kennel at the Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (www.cpqgm.fiocruz.br), in a non-endemic area for VL, where they underwent routine medical examinations, and regularly received multivalent and rabies vaccines, and deworming medication.

A comparative study of sick *Leishmania*-infected and healthy non-infected animals was made in material collected from 15 dogs with VL, and from 14 healthy dogs, all of them from an endemic area for VL (cities located at the North-East of Bahia State, Brazil). The polysymptomatic animals had been tested positive for anti-*Leishmania* antibodies in serological tests, and their diagnoses were confirmed by the observation of amastigotes in spleen aspirate cultures. This group of animals included mongrel and purebred dogs, of both sexes, having different body sizes, and ages varying from ten months to eight years old (Table 1). All of them were domiciled. They were considered polysymptomatic when at least three of the following signs were present: lesions in the skin and mucous membranes; changes in colour of the mucous membranes; abnormal growth of the claws; ocular and conjunctival

disorders; presence of abnormal discharges; weight loss; changes in mental attitude and general disposition; enlargement of lymph nodes and spleen; bleeding events; cutaneous changes (alopecia, depigmentation, exfoliation, nodules, ulceration and/or pustule formation); onychogryphosis; mucous membrane colour changes (paleness, icterus or congestion); mucous membrane nodular or ulcerative lesions, particularly on the lips and nose; ocular disturbances (conjunctivitis, keratitis, keratoconjunctivitis sicca, blepharitis and/or uveitis); weight loss; apathy or prostration; splenomegaly; lymphadenopathy; epistaxis; and gingival or abnormal genital bleeding. The fourteen control dogs were from a breeding kennel, maintained under sanitary and nutritional control by veterinary supervision, which included regular testing for canine common infectious diseases. All of them were adults, with ages varying from two to six years old, of both sexes, clinically healthy and negative in serological and parasitological tests for VL.

2.2. Ethics

All procedures carried out on the animals were in accordance with guidelines defined by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the Oswaldo Cruz Foundation, Brazil.

2.3. Spleen and blood sample collection

The procedure for spleen aspiration was performed in accordance with a previously reported technique (Barrouin-Melo et al., 2005). Briefly, following tranquilization with an intravenous injection of 0.5 mg/kg of acepromazine, the dogs were restrained in right lateral recumbency, the hair was removed and asepsis achieved by rubbing a 2% iodine-alcohol solution over the skin. The spleen was localized by palpation and the aspiration made with 18G x 38 mm or 21G x 32 mm needles, depending on the dogs size, connected to a 10 mL

sterile syringe. The access to the organ was determined by the paracostal approach, and the needle introduced in the left flank, one to three centimetres from the ventral extremity of the last rib. After perforating the spleen, the gentlest negative pressure that allowed the passage of a blood-like, thick material into the syringe was made by pulling the syringe's piston. The whole aspiration procedure usually took a few seconds, and yielded samples of approximately 100-400 μ L. The material was carefully flushed into a sterile tube containing 10 mL of RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) with 50 UI/mL of heparin and kept on ice, until being processed in the laboratory, for leukocyte purification. The remaining spleen material in the syringe was kept inside it to be seeded into culture medium, for parasitological diagnosis.

Ten mL volumes of peripheral blood were collected from the antebrachial cephalic vein. Of these, 2 mL were carefully mixed with 10 mL of RPMI/heparin medium and kept on ice until its processing for leukocyte purification. The remaining amount of blood was drawn into a blood clotting tube for the preparation of serum.

2.4. Serological and parasitological diagnosis of visceral leishmaniosis

2.4.1. ELISA for IgG, IgG1 and IgG2

The presence of anti-*Leishmania* antibodies in the sera of all studied dogs was investigated by a classical indirect ELISA, using soluble *L. chagasi* antigens (SLA), as described by Paranhos-Silva and collaborators (1996), with few modifications. Pools of positive or negative canine sera for anti-*Leishmania* antibodies were used as controls. The SLA consisted of the soluble fraction (the supernatant of a 10,000 g, 30 minutes centrifugation) of lysed promastigotes from a local *Leishmania* strain, isolated from a sick dog, and characterized as *L. chagasi* by means of isoenzyme electrophoresis and comparison with a reference strain (LTCC - *Leishmania* Typing Culture Collection - WDCM731).

Briefly, 96-well plates (Corning-Costar Corp., New York, USA) were coated with the antigen overnight at 4° C (incubation with 100 µl per well of 5 µg of protein per mL of 0.1M carbonate-bicarbonate solution, pH 9.6). Non-specific antibody binding was blocked with 5% skimmed milk (w/v) in 0.15 M phosphate-buffered saline solution, pH 7.4 (PBS), containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), for 1 hour, at 37° C. Control and test serum samples were added at 1:400 dilution in 1% skimmed milk in PBS-T, 100 µl/well, and incubated for 1 h at 37° C. A peroxidase-conjugated rabbit anti-dog IgG (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) was added at the dilution of 1:5,000 in 1% skimmed milk in PBS-T, 100 µL/well and incubated for 1 h at 37° C. The enzymatic reaction was developed with *o*-phenylenediamine (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) and stopped after 15 min with 25 µL/well of 4N H₂SO₄. Absorbance values were read at 490 nm. The cut-off value for IgG antibodies was determined by the ROC (Receiver Operating Characteristics) curve, using corrected absorbance values obtained with sera from 30 *L. chagasi*-infected dogs, positive in serological and parasitological tests, and from 71 healthy dogs, living in non-endemic areas (Griner et al., 1981). All determinations were carried out in triplicate and the mean values above the cut-off for IgG were considered to be positive results.

For determination of IgG1 and IgG2 antibody activities against *Leishmania* antigens, the sera of the infected animals were tested in an indirect ELISA, utilizing peroxidase-conjugated goat anti-dog IgG1 or sheep anti-dog IgG2 (Bethyl, Montgomery, USA), at dilutions of 1:600 and 1:2,500, respectively, in the protocol described above.

2.4.2. Culture and microscopy for parasite detection

Samples of spleen aspirates were cultured in a biphasic medium containing 1.5 mL of blood-agar (solid medium) and 2 mL of Schneider's (liquid) medium (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) supplemented with 20% of fetal bovine serum (Gibco BRL, Grand Island,

USA). Cultures were maintained at 23° C and examined weekly under light microscopy for one month for the presence of live, active promastigote forms. The direct microscopic examination of cytopsin preparations of spleen cells was also performed, in order to evaluate the usefulness of the processed slides for parasitological diagnosis and for the possible assessment of parasite load in the spleen.

2.5. Preparation of cell suspensions and cytopsin

Spleen or blood samples, previously diluted 1:6 in RPMI / heparin solution, were further diluted 1:4 in PBS containing EDTA to a final concentration of 1 mg/mL, and centrifuged for 10 minutes at 450 g at room temperature (RT). The supernatant was discarded and the erythrocytes were lysed by incubation with a 10% (w/v) ammonium chloride solution in H₂O for 10 minutes. After a step of centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet washed twice with Hank's buffered salt solution (HBSS, Sigma Chemical Co., St Louis, USA) for 10 minutes at 450 g, at RT. The purified leukocyte-pellet was resuspended in HBSS to a concentration of 1×10^7 cells/mL. Three different procedures were compared in terms of their capacity to confer adherence to glass and to preserve morphological aspects of the leukocytes. In one procedure, cell suspensions were diluted in an equal volume of Shandon cell collection fluid (Thermo Shandon, Pittsburgh, USA). and cytocentrifuged (100 µL/well at 350 g during 10 minutes; Revan Scientific Instruments, São Paulo, Brazil). In the other two procedures, the cells were not diluted with Shandon cell collection fluid but were cytocentrifuged onto poly-L-lysine- or Silane (Sigma Chemical Co., St Louis, USA)-covered slides [Referências]. The slides were air-dried at RT, fixed with 100% acetone at 4° C for 5 minutes, and stored at -70°C, in plastic boxes, until being utilized in the assays.

2.6. Staining assays and leukocyte populations' count

Cytospin preparations were stained with Wright's and hematoxylin-eosin (H-E) techniques and examined by conventional microscopy for differential leukocyte counting, parasite identification, assessment of the rate of macrophage infection and estimation of parasite burden. A total of 500 cells were counted with 40X objective lens, and the amount of parasitized cells was expressed as percentage of the whole leukocyte population.

2.7. Immunostaining assays

2.7.1. Monoclonal and polyclonal antibodies

Rat anti-canine CD45RA (YKIX 753.22 clone; Cobbold & Metcalfe, 1994) and anti-canine CD45RB (YKIX 716.13 clone; Cobbold & Metcalfe, 1994) monoclonal antibodies (mAbs) were a kind gift from Dr. S. Cobbold. A mouse IgG2a anti-canine pan-leukocyte marker, the AB6 mAb, which has a reactivity pattern, both in terms of cell and tissue epitope localization, and of the molecular weights of the recognized proteins, compatible with that of an anti-CD45 antibody (Aguiar et al., 2004a), and a mouse IgG1 anti-canine monocyte/macrophage and polymorphonuclear cell antigen, the IH1 mAb (Aguiar et al., 2004b), were developed and tested in our laboratory. All mAbs were used unlabeled. IgG from normal rat or mouse sera was used as isotype controls. Biotinylated rabbit anti-mouse or rat IgG (Vector Lab. Inc., Burlingame, USA) were used as secondary antibodies. FITC-labeled streptavidin (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) was utilized for immunofluorescence assays and peroxidase-conjugated stravidin (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) for immunocytochemistry assays. The optimal dilutions of each mAb, and of the secondary antibodies and streptavidin conjugates, were previously determined by testing them, serially diluted, in the immunocytoassays.

2.7.2. Immunofluorescence and immunocytochemistry

The immunofluorescence technique was utilized for testing the reactivity of the monoclonal antibodies with the canine spleen cells, and the immunocytochemistry for the differential countings. Blood and spleen cytopsin preparations were rehydrated with PBS, during 1 minute, at RT. For the immunofluorescence, non-specific binding was blocked by incubation with PBS containing 10% of normal rabbit serum and 1% of fetal calf serum (Gibco BRL, Grand Island, USA), for 30 minutes, at RT, in a moist chamber. Cells were washed twice in PBS-T bath for 1 minute. The monoclonal antibodies were added at a dilution of 1:10 (anti-CD45RA, anti-CD45RB) or 1:40 (AB6 and IH1) in PBS, and incubated for 1 hour, in a moist chamber, at RT. Pure diluent, and mouse or rat sera, diluted at 1:500 were used as negative controls for each assay. After two washing steps, biotinylated secondary anti-mouse (1:100) or anti-rat (1:200) antibodies were overlaid and incubated for 1 hour in a moist chamber, at RT. Following two washing steps, FITC-labeled streptavidin was added and incubated for 30 minutes, in a dark room. The slides were washed twice with PBS-T, and 50 µg/mL of propidium iodide in PBS was incubated for 1 minute to stain the cell nucleus. After two more washings with PBS-T, followed by distilled water washings, the slides were covered with an anti-fading solution, consisting of 10 mg/mL orthophenylene diamine (Sigma Chemical Co., St Louis, USA), in a 90% glycerol/PBS solution (v/v), mounted with coverslips and examined using fluorescent light microscopy.

For the immunocytochemistry, after the rehydration step, the cytopsin preparations were overlaid with an endogenous peroxidase-blocking solution, consisting of 0.015 % NaN_3 and 3 % 30-volume H_2O_2 in PBS, and incubated for 15 minutes. PBS-T washings were carried out and blocking of non-specific binding was performed by incubation with 10% normal rabbit serum. Cells were washed twice with PBS-T and the anti-CD45RA (1:20), anti-CD45RB (1:20), AB6 (1:100) or IH1 (1:40) mAbs, diluted in PBS, or the isotype controls,

were added and incubated for 1 hour, in a moist chamber, at RT. After two washing steps, secondary biotinylated anti-mouse (1:100) or anti-rat (1:200) antibodies were overlaid and incubated for 1 hour in a moist chamber, at RT. Following two washing steps, peroxidase-conjugated streptavidin was added and incubated for 1 hour, in a moist chamber, at RT. The slides were washed twice with PBS-T and a substrate solution, consisting of 1 % diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) and 2 % H₂O₂ in PBS, was applied for 1 to 3 min. After two more PBS-T and two distilled water washings, the cells were counterstained with hematoxilin and examined by light microscopy. For determining leukocyte subpopulations, 500 cells were counted with a 40X objective lens, and the proportion of stained cells was expressed as a percentage of the whole leukocyte population.

2.8. Statistical analysis

The differences between groups were evaluated using the unpaired Student's *t*-test. The F test was applied to compare variances. P values under 0.05 were considered to be statistically significant. The calculations were performed with Prism® software (GraphPad Software Inc.).

3. Results

3.1. Fine-needle aspiration provides material for good-quality cytopsin preparations of spleen

All dogs tolerated well the spleen aspirations and no complications were observed or reported during or after the procedures. The volume of the obtained spleen samples varied from 100 to 400 µL. Cell yields varied from 2 x 10⁷ to 8 x 10⁷ viable spleen or peripheral blood leukocytes. The use of Silane, poly-L-lysine or Shandon cytopsin fluid led to similar numbers of cells retained in the cytopsin preparations (not shown). The Shandon fluid,

however, was superior in terms of preservation of cell morphology (Figure 1). Both the H-E and Wright' staining methods allowed the differential counting of leukocyte populations. Spleen samples kept small sparse fragments of stromal tissue in the midst of the single cell suspensions, mostly composed by lymphocytes of various sizes (Figure 1b). These fragments were characterized by groups of mononuclear cells, most with macrophage morphology. The cytospin preparations were appropriate for the visualization of *Leishmania* amastigotes (Figure 1c) and for immunocytochemical (Figure 1d) and immunofluorescence (Figure 1e) techniques.

3.2. Parasitological and serological profile of dogs with clinical signs of visceral leishmaniosis

No *Leishmania* parasites were isolated from animals in the healthy group and their serum IgG anti-*Leishmania* antibody activities were always under the cut-off value. All symptomatic dogs were positive for *Leishmania chagasi* / *infantum* in the culture of spleen aspirates (not shown) and in 13 of them in which IgG anti-*Leishmania* antibody was tested for, its level was above the cut off value (Table 1). Parasite-specific IgG1 (mean O.D. = 0.479 \pm 0.367) and IgG2 (mean O.D. = 1.862 \pm 0.248) antibodies were also detected in their sera. In addition to being lower, there was a greater variability in the levels of IgG1 antibodies than in those of IgG2 (Table 1).

Variable proportions of parasitized cells were seen in cytospin preparations (Table 1).

3.3. Differences between the proportions of leukocytes in the spleen and blood of healthy dogs

As shown in the Figure 2a, the spleen aspirates of healthy dogs from areas without leishmaniosis have a higher proportion of lymphocytes (P = 0.0064) and a lower proportion of

neutrophils ($P = 0.012$) than blood samples. The ratios between mean percentages of neutrophils and lymphocytes were of 0.27 (0.27 : 1.0) in spleen samples, and of 3.2 (3.2 : 1.0) in peripheral blood samples. There was no statistically significant difference between blood and spleen in the monocytes / macrophages or eosinophils' proportions. The presence of mast cells or basophils was sporadic in the samples from both origins. Similar findings were obtained from the 14 healthy animals of the endemic area for VL (Figure 2b). The spleen samples in this group showed a higher proportion of lymphocytes ($P < 0.0001$) and a lower proportion of neutrophils ($P < 0.0001$) when compared with peripheral blood samples, with neutrophils : lymphocytes ratios of 0.4 and 3.5, respectively in spleen and blood. No difference was observed in the proportions of monocytes / macrophages or eosinophils.

3.4. Leishmania-infected polysymptomatic dogs undergo changes in spleen leukocyte populations

The group of symptomatic animals also showed a higher proportion of lymphocytes ($P = 0.0007$) and a lower proportion of neutrophils ($P = 0.0003$) in spleen aspirates than in the peripheral blood (Figure 2c). These animals, however, had a significantly higher proportion of mononuclear phagocytes in the spleen than in the peripheral blood ($P = 0.0084$). In addition, they had a higher proportion of neutrophils ($P < 0.0001$) and macrophages ($P = 0.0036$) and a lower proportion of lymphocytes ($P < 0.0001$) in the spleen than the healthy controls from the endemic area (Figure 2.d). The splenic neutrophils : lymphocytes ratio was of 0.4 in the healthy animals, while in the symptomatic dogs' group it was of 1.5. No statistical differences were found among blood samples of sick and healthy dogs (not shown).

3.5. Proportions of cells expressing different surface markers in symptomatic *Leishmania*-infected dogs

The spleen of *Leishmania*-infected dogs had higher relative numbers of CD45RB⁺ ($P = 0.0004$), AB6⁺ ($P < 0.0001$) and IH1⁺ cells ($P < 0.0001$), and lower counts of CD45RA⁺ cells ($P < 0.0001$) (Figure 3a) than the spleen of healthy dogs. The same differences between *Leishmania*-infected and healthy animals was found for blood cells ($P < 0.05$; Figure 3b).

4. Discussion

This work is part of a series of studies on the potential use of fine-needle spleen aspiration in the dog, as a source of material for etiological and pathophysiological studies, focused in VL. Previous reports have documented the better sensitivity achieved with spleen samples for the parasitological diagnosis of CVL, in comparison to lymph node samples (Barrouin-Melo et al., 2004), and demonstrated the safety of fine-needle spleen aspiration in dogs with VL (Barrouin-Melo et al., 2005). In the present study, its applicability to cytological and immunochemical studies is shown.

The parasitological diagnosis of *Leishmania* infection is the most common reason for the collection of canine spleen samples (Strauss-Ayali et al., 2004).

Some authors have drawn attention to the limited amount of material usually obtained from the fine-needle aspiration of human spleens (Zeppa et al., 2003), and the loss of cells during the immunochemical processing of canine specimens (Tipold et al., 1998). In order to minimize such problems, different products and protocols for cytopsin preparation were compared, and a better cell morphology was shown to be obtained by using the Shandon reagent. Approximately 250 μ L of spleen aspirates yielded about 10^7 purified leukocytes, which allowed the production of about 20 cytopsin spots, containing 5×10^5 cells each. Using commercially available monoclonal antibodies (anti-CD45RA and anti-CD45RB) and

antibodies developed in our laboratories (AB6 and IH1), these cytopins were shown to provide appropriate cells for immunochemical studies. These results are in agreement with Zeppa and collaborators' observations in human spleen samples (2003). Immunocytochemistry performed in cytopsin preparations of canine spleen aspirates, therefore, allowed the quantification of spleen leukocyte subpopulations.

All *Leishmania*-infected dogs studied herein, which were tested for circulating anti-*Leishmania* antibodies, had high levels of total IgG and IgG2 antibodies, and most of them had also IgG1 antibodies. These high levels of both IgG subclasses may be a marker of active CVL, since concomitant high levels of IgG1 and IgG2 have been associated to progressive disease (Deplazes et al., 1995; Bordoiseau et al., 1997; Nieto et al., 1999; Quinnell et al., 2003).

The concentration of leukocytes by cytopsin, and their staining by H-E, may allow an easier visualization of amastigote forms inside phagocytes than it could possibly be in spleen aspirate smears. The procedure can indeed allow the quantification of parasites and parasitized cells, and, consequently, the determination of parasite loads in infected animals. It could therefore be useful in terms of prognosis and of monitoring novel therapeutic procedures.

Leishmania-infected and healthy animals differed in terms of leukocyte profiles, both in the blood and in the spleen. Higher proportions of neutrophils, and particularly of macrophages, were found in the spleen of dogs with VL than in the spleen of healthy dogs. This was confirmed by the finding of increased proportions of IH1-stained cells in the infected dog samples. Several reports have indeed described histopathological changes in the spleen of infected, symptomatic or asymptomatic dogs, being the most common findings a granulomatous inflammatory reaction, characterized by mononuclear cell infiltration and macrophage hyperplasia (Kontos & Koutinas et al., 1993; Oliveira et al., 1993, Natami et al.,

2000; Tafuri et al., 2001). They are also in accordance with the finding, by flow cytometry, of high numbers of CD11c⁺ and monocyte / macrophage cells in the spleen of *Leishmania*-infected dogs (Sanchez et al., 2004), and with a reported increase in numbers of reticuloendothelial cells in spleen aspirates in human VL (Haque et al., 1992). Striking changes in the splenic micro-architecture have been associated to high levels of the TNF cytokine family members in murine and human visceral leishmaniosis, and are characterized by white pulp atrophy, loss of T cells from the periarteriolar areas, and a widespread infiltration of macrophages in the white and red pulp (Engwerda et al., 2002; Kaye et al., 2004). On the other hand, in a murine experimental model of VL, an enhanced organ-specific hematopoietic activity, mediated by the colony-stimulating factors GM-CSF, M-CSF and G-CSF, was described as responsible for the accumulation of progenitor cells of the macrophage and granulocyte lineage in the spleen (Cotterell et al., 2000). These phenomena may take place in infected canine spleens as well, and could explain the findings reported herein.

The low proportions of spleen lymphocyte population in dogs with VL, found in the present study, can reflect a CVL-associated immunodeficiency involving T cells, which has been discussed elsewhere (Martinez-Moreno et al., 1993; Pinelli et al., 1994, 1999; Moreno et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2000; Guarga et al., 2000, 2002; Sanchez et al., 2004).

The changes in number of these spleen cell populations can be a valuable source of information for the monitoring of the possible effects of vaccine and/or immunotherapy candidates, in leishmaniosis, other canine infectious or lymphoproliferative diseases, as well as for their clinical prognosis.

Naïve T cells, helper T cells secreting IFN- γ and a wide range of B cells express the high molecular weight (220-240 kDa) CD45RA antigen (Cobbold and Metcalfe, 1994; Zuckermann et al., 1998), while the CD45RB antigen has been associated to activated CD4⁺ T cells (Varga and Welsh, 1996; Sutherland et al., 2002; Gomes-Pereira et al., 2004). The

increased proportions of CD45RB⁺ and CD45⁺ (identified by AB6 mAb) cells in *Leishmania*-infected dogs, in relation to healthy controls, can be explained by T-cell activation during the outcome of the infection. This could also account for the observed reduction in numbers of naïve CD45RA⁺ T cells, which would change its CD45R phenotype upon activation, in the sick dog group (Guglielmino et al., 2004). Infection by parasites of the *Leishmania* genus has indeed been characterized by reduction of CD45RA⁺ cell populations in human skin lesions (Pirmez et al., 1990) or canine blood (Guarga et al., 2000; 2002). Few works have described the *in situ* analysis on the percentages of CD45RA-expressing cells in canine lymphoid or other tissues, and all of them on post-mortem specimens: a decrease has been reported in lymphoid tissues (Sanchez et al., 2004) and skin (Papadogiannakis et al., 2005) in CVL.

The data reported herein are the first to describe and quantify leukocyte populations and subpopulations in dogs, using spleen aspirates from healthy and *Leishmania*-infected symptomatic dogs. The use of aspirates and immunochemical analysis may make possible the sequential monitoring of spleen-cell alterations during pathological processes. The information acquired in this way may improve the definition of prognosis, the follow-up of therapeutic responses and the carrying out of research on splenic immunoregulation and the pathogenic mechanisms involved in many infectious and/or immune-mediated canine diseases.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian National Council for Research and Technological Development (CNPq).

References

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamin, N., Campino, L., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 13, 537-550.
- Aguiar, P.H., Borges dos Santos, R.R., Lima, C.A., Rios de Sousa, Gomes, H., Laranjeira, D.F., Santos, P.M., Barrouin-Melo, S.M., Conrado dos-Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L., 2004a. Production of monoclonal antibodies against canine leukocytes. *Hybridoma and Hybridomics* 23, 127-132.
- Aguiar, P.H., Borges dos Santos, R.R., Laranjeira, D.F., Almeida dos Santos, M., Barrouin-Melo, S.M., Silva, T.M., Mengel, J.O., Conrado dos Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L., 2004b. A novel monoclonal antibody against canine monocytes/macrophages. *Hybridoma and Hybridomics* 23, 250-257.
- Barrouin-Melo, S.M., Laranjeira, D.F., Trigo, J., Aguiar, P.H.P., Dos-Santos, W.L.C., Pontes-de-Carvalho, L., 2004. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 195-197.
- Barrouin-Melo, S.M., Laranjeira, D.F., Andrade-Filho, F.A., Trigo, J., Julião, F.S., Franke, C.R., Aguiar, P.H.P., dos-Santos, W.L.C., Pontes-de-Carvalho, L., 2005. Can spleen aspirations be safely used for parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *The Veterinary Journal*. In press.
- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadore, J.L., Bourdoiseau, G., 2001. Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal* 162, 108-120. 2001.
- Christopher, M.M., 2003. Cytology of the spleen. *Vet. Small Anim.* 33, 135-152.
- Cobbold, S., Metcalfe, S., 1994. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens*, v. 43, p. 137-154. 1994.
- Cotterell, S.E., Engwerda, C.R., Kaye, P.M., 2000. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* 68, 1840-1848.
- Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J., 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451-458.
- Engwerda, C.R., Ato, M., Cotterell, S.E., Mynott, T.L., Tschannerl, A., Gorak-Stolinska, P.M., Kaye, P.M., 2002. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. *Am. J. Pathol.* 161, 429-437.

- Faldyna, M., Sinkora, J., Knötigová, P., Levá, L., Toman, M., 2005. Lymphatic organ development in dogs: major lymphocyte subsets and activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 239-247.
- Ferrer, L., Aisa, M.J., Roura, X., Portús, M., 1995. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Records*, 136, 514-516.
- Gomes-Pereira, S., Rodrigues, O.R., Santos-Gomes, G.M., 2004. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 95, 63-70.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribanez, M.A., Alvar, J., Castillo, J.A., 2000. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res. Vet. Sci.* 69, 249-253.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A., Castillo, J.A., 2002. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 13-20.
- Guglielmino, R., Miniscalco, B., Tarducci, A., Borgarelli, M., Riondato, F., Zini, E., Borrelli, A., Bussadori, C., 2004. Blood lymphocyte subsets in canine idiopathic pericardial effusion. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 98, 167-173.
- Haque, I., Haque, M.Z., Krishnani, N., Srivastava, S.P., Khan, E.M., 1993. Fine needle aspiration cytology of the spleen in visceral leishmaniasis. *Acta Cytol.* 37, 73-76.
- Iniesta, L., Fernández-Barreto, S., Bulle, B., Gómez, M.T., Piarroux, R., Gállego, M., Alunda, J.M., Portús, M., 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 1137-1141.
- Kaye, P.M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S., Engwerda, C.R., 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol. Rev.* 201, 239-253.
- Kontos, V.J., Koutinas, A.F., 1993. Old World canine leishmaniasis. *Compendium on Continuing Education Small Animal* 15, 949-959.
- Martinez-Moreno, A., Martinez-Cruz, M.S., Blanco, A., Hernandez-Rodriguez, S., 1993. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 51, 49-59.
- Melby, P.C., Tabares, A., Restrepo, B.I., Cardona, A.E., McGuff, H.S., Teale, J.M., 2001. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control infection. *Experimental Parasitology* 99, 15-25.

- Molina, R., Lohse, J.M., Pulido, F., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Alvar, J., 1999. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 51-53.
- Moreno, J.; Nieto, J.; Chamizo, C.; González, F.; Blanco, F.; Barker, D. C.; Alvar, J., 1999. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis, before and after chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 181-195.
- Natami, A., Sahibi, H., Lasri, S., Boudouma, M., Guessouss-Idrissi, N., Rhalem, A., 2000. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. *Vet. Res.* 31, 355-363.
- Nieto, C.G., Garcia-Alonso, M., Requena, J.M., Miron, C., Soto, M., Alonso, C., Navarrete, I., 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 117-130.
- Oliveira, G.G., Santoro, F., Sadigursky, M., 1993. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88, 243-248.
- Paranhos-Silva, M., Freitas, L.A.R., Santos, W.C., Grimaldi Jr, G., Pontes-De-Carvalho, L.C., Oliveira-Dos-Santos, A.J., 1996. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 39-44.
- Papadogiannakis, E.I., Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., Vlemmas, J., Lekkas, S., Karameris, A., Fytianou, A., 2005. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 227-237.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernardina, W., Real, G., Ruitenberg, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity* 62, 229-235.
- Pinelli, E., Gonzalo, R.M., Boog, C.J., Rutten, V.P., Gebhard, D., Del-Real, G., Ruitenberg, E.J., 1995. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur. J. Immunol.* 25, 1594-1600.
- Pinelli, E., Rutten, V.P., Bruysters, M., Moore, P.F., Ruitenberg, E.J. 1999. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect. Immun.* 67, 237-243.

- Pirmez, C., Cooper, C., Paes-Oliveira, M., Schubach, A., Torigian, V.K., Modlin, R.L., 1990. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J. Immunol.* 145, 3100-3104.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L.M., Kaye, P.M., Shaw, M.A., Dye, C., Day, M.J., 2003. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 161-168.
- Reis, A.B., Carneiro, C.M., Carvalho, M.G., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Genaro, O., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., 2005. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 173-185.
- Sanchez MA, Diaz NL, Zerpa O, Negron E, Convit J, Tapia FJ., 2004. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 618-624.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2000. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 90, 37-45.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infect. Dis.* 189, 1729-1733.
- Sutherland, R.M., McKenzie, B.S., Zhan, Y., Corbett, A.J., Fox-Marsh, A., Georgiou, H.M., Harrison, L.C., Lew, A.M., 2002. Anti-CD45RB antibody deters xenograft rejection by modulating T cell priming and homing. *Int. Immunol.* 14, 953-962.
- Tafari, W.L., De-Oliveira, M.R., Melo, M.N., Tafuri, W.L., 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.* 96, 203-212.
- Tipold, A., Moore, P., Jungi, T.W., Sager, H., Vandeveld, M., 1998. Lymphocyte subsets and CD45RA positive T-cells in normal canine cerebrospinal fluid. *J. Neuroimmunol.* 82, 90-95.
- Varga, S.M., Welsh, R.M., 1996. The CD45RB-associated epitope defined by monoclonal antibody CZ-1 is an activation and memory marker for mouse CD4 T cells. *Cell. Immunol.* 167, 56-62.
- Williams, D.L. 1997. Studies of canine leukocyte antigens: a significant advance in canine immunology. *The Veterinary Journal* 153, 31-39.

- Zeppa, P., Vetrani, A., Luciano, L., Fulciniti, F., Troncone, G., Rotoli, B., Palombini, L., 1994. Fine needle aspiration biopsy of the spleen. A useful procedure in the diagnosis of splenomegaly. *Acta Cytol.* 38, 299-309.
- Zeppa, P., Picardi, M., Marino, G., Troncone, G., Fulciniti, F., Vetrani, A., Rotoli, B., Palombini, L., 2003. Fine-needle aspiration biopsy and flow cytometry immunophenotyping of lymphoid and myeloproliferative disorders of the spleen. *Cancer* 99, 118-127.
- Zuckermann, F.A., Peavey, C., Schnitzlein, W.M., Schabacker, D., Husmann, R.J., Yang, H., Saalmuller, A., Lunney, J.K., 1998. Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 60, 367-387.

Table 1: General, parasitological and serological profile of polysymptomatic animals from an area endemic for visceral leishmaniosis.

Animal	Age (year)	Gender	Breed	Parasite load ^(a)	Anti- <i>Leishmania</i> antibody activity (OD)		
					IgG1 ^(b)	IgG2 ^(c)	Total IgG ^(d)
# 1	1	M	Dobermann	31	0.15	1.98	1.72
# 2	6	M	Beagle	4	0.63	2.05	1.85
# 3	0.8	M	Brazilian Fila	3	0.49	2.27	2.10
# 4	4	F	Mongrel	47	0.94	1.78	2.40
# 5	3	F	Mongrel	26	NT	NT	NT
# 6	1	F	Mongrel	2	0.61	1.68	1.82
# 7	2	M	Brazilian Fila	14	0.18	1.53	1.48
# 8	1	F	Poodle	9	1.47	1.68	1.86
# 9	2	M	Beagle	2	0.26	1.93	2.01
# 10	3	F	Mongrel	3	0.23	1.77	2.02
# 11	1	F	Rottweiler	4	0.35	2.46	1.94
# 12	5	F	Mongrel	-	0.18	1.77	1.99
# 13	5	M	Rottweiler	1	0.58	1.79	1.97
# 14	8	M	German Shepperd	6	0.20	1.93	1.86
# 15	1	M	Pitbull	1	NT ^(e)	NT	NT

^(a) Number of parasitized cells per 500 mononuclear cells in HE-stained cytospin spleen aspirates, under optical microscopy.

^(b) Individual median values for IgG1; positive control OD = 0.498 and negative control OD = 0.066.

^(c) Individual median values for IgG2; positive control OD = 1.990 and negative control OD = 0.110.

^(d) Individual median values for total IgG; positive control OD = 2.200 and negative control OD = 0.117; cut-off = 0.392.

^(e) NT = non tested.

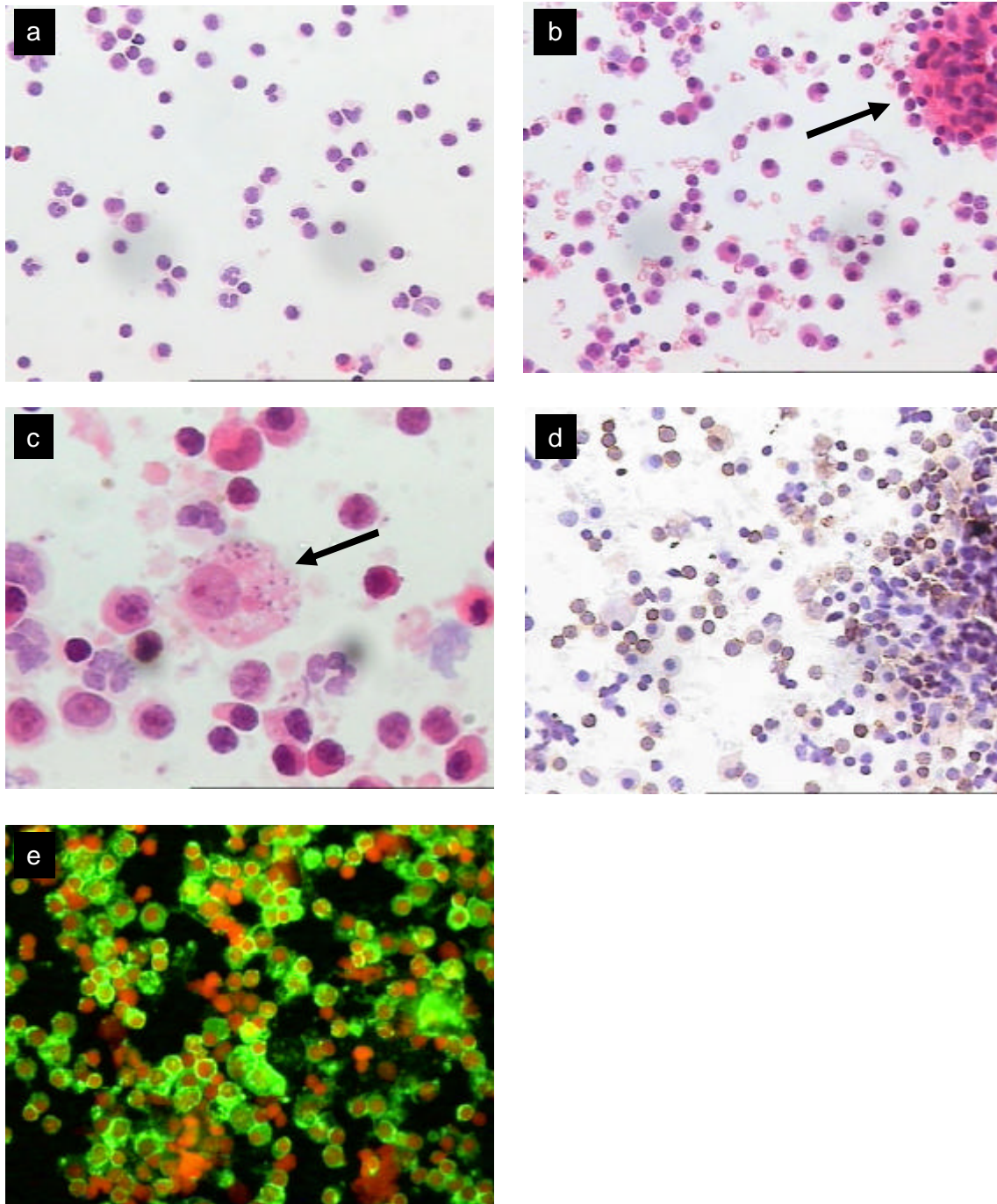


Figure 1. Morphology of blood (a) and spleen (b, c) cells, and staining with the AB6 monoclonal antibody, by immunocytochemistry (d) and indirect immunofluorescence (e), in cytopsin preparations. A fragment of stromal tissue can be seen in b, and a large macrophage, containing amastigote forms of *Leishmania*, in c (arrows). H-E staining in a, b and c; original magnification X 40 in a, b, d and e; original magnification X 100 in c.

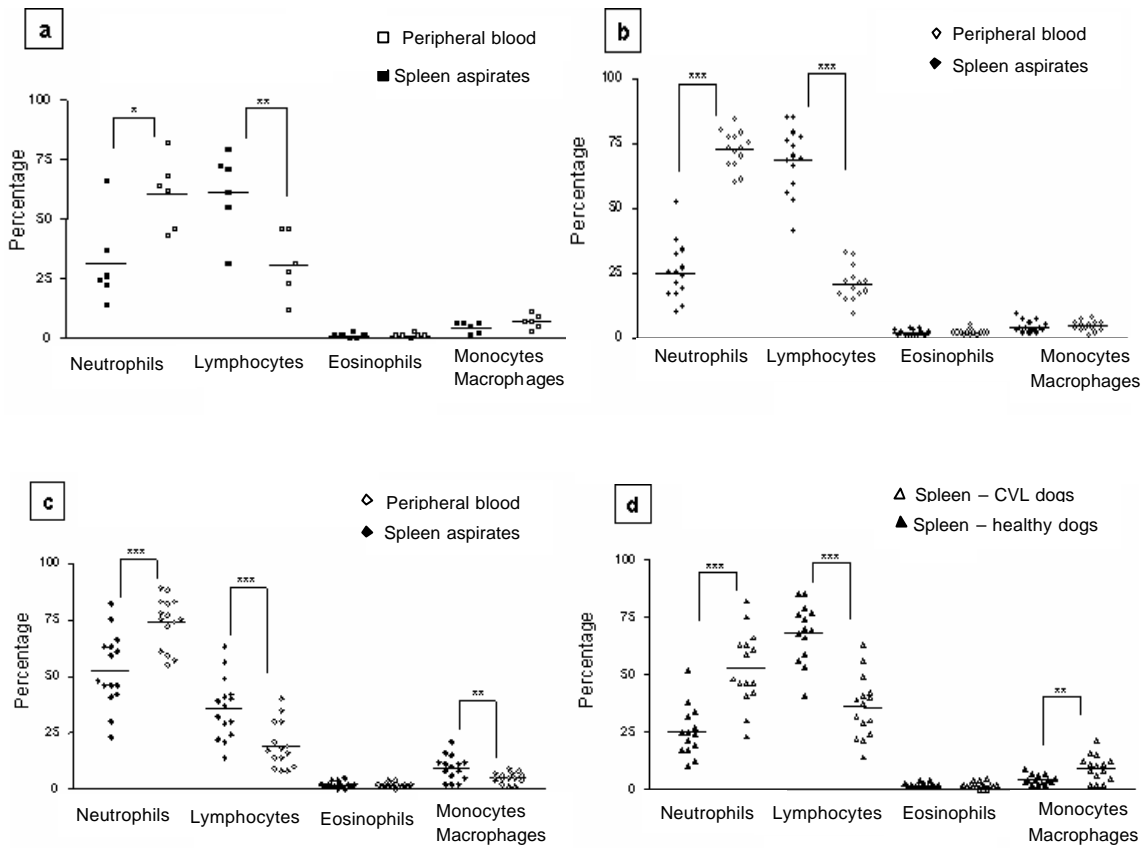


Figure 2. Relative counts of canine leukocyte populations in spleen and blood cytopsin preparations, stained by Wright's technique. Samples were obtained from: (a) 6 healthy dogs, from an area free of CVL; (b, d) 14 healthy non-infected dogs from an endemic area of visceral leishmaniosis; (c, d) 15 polysymptomatic *Leishmania*-naturally infected dogs. Statistical significance, T test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

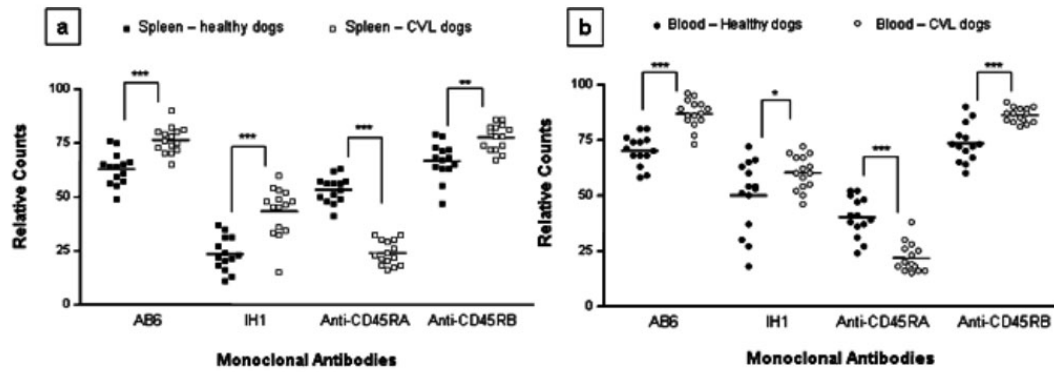


Figure 3. Proportion of spleen (a) and blood (b) cytopsin preparations from healthy (■) and polysymptomatic *Leishmania*-infected (□) dogs, from an endemic area for visceral leishmaniosis, stained with AB6 (anti-CD45), IH1 (anti-phagocytes), YKIX-753 (anti-CD45RA), and YKIX-716 (anti-CD45RB) monoclonal antibodies, by immunoperoxidase. Statistical significance, *t* test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As propostas de buscar e caracterizar parâmetros esclarecedores sobre o papel do baço na infecção natural por *L. chagasi* no cão e, por meio do desenvolvimento de um método para avaliar aspectos da resposta imune específica desse órgão, trazer contribuições para o conhecimento da resposta imune canina ao protozoário, pautaram a realização do presente estudo. Ainda, um aspecto importante do método padronizado para análise das células esplênicas seria que ele permitisse o acesso a informações sobre a dinâmica órgão-específica de subpopulações leucocitárias no animal vivo, sem a ele imprimir sofrimento e privações. Assim, o procedimento de coleta de amostras seria passível de repetições ao longo do tempo, possibilitando análises seqüenciais dos componentes esplênicos, fundamentais nas avaliações da resposta de animais em testes com preparações candidatas a imunoterapia e vacinas *in vivo*.

Inicialmente, foi avaliado um aspecto diretamente relacionado à infecção no órgão, que é a sua aplicabilidade como fonte de amostras para exames parasitológicos, em comparação com outro método comumente citado na literatura, a aspiração de linfonodos. O exame parasitológico de amostras de um grupo de 64 animais soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania* – 100% de soropositividade – permitiu 73% de resultados positivos no cultivo de amostras de aspirado esplênico em meio bifásico, em comparação com 18% de positividade, quando as amostras foram aspirados de linfonodo. Considerando-se apenas o grupo de 48 animais, nos quais a infecção foi confirmada pelo isolamento do parasito, os valores de positividade passaram a ser da ordem de 98% e 25%, respectivamente, para amostras de baço e de linfonodo. Ainda, a positividade nas culturas de amostras esplênicas foi significativamente mais freqüente em animais sintomáticos do que em animais assintomáticos. Por outro lado, em todos os animais assintomáticos nos quais o parasitismo foi identificado (19/19) foram observados parasitos nos cultivos de aspirado esplênico, enquanto em apenas 15% desses animais foram identificados parasitos nos cultivos de amostras de linfonodo (3/19). O achado de parasitos nos linfonodos foi portanto ocasional, não se encontrando correlação entre a freqüência de resultados positivos em amostras de linfonodo e presença de sinais clínicos, com o método de análise estatística utilizado (teste de probabilidade exata

de Fisher). Partindo do princípio de que o parasitismo nos linfonodos superficiais pode refletir o parasitismo na pele, e não necessariamente equivaleria à infecção e doença viscerais, nossos achados seriam corroborados pelos resultados encontrados por TAFURI e colaboradores (2001), que descreveram, no Brasil, um quadro histopatológico de um cão com um conjunto exuberante de sinais clínicos de LV sem, no entanto, apresentar parasitismo cutâneo. Como os autores observaram também abundantes alterações dermatológicas e intenso parasitismo visceral, eles aventaram a hipótese de que a presença ou ausência de parasitos na pele poderia independe de parasitismo visceral, e vice-versa. Em um estudo histopatológico de linfonodos de cães infectados por *L. chagasi*, LIMA e colaboradores (2004) não encontraram correlações entre intensidade de parasitismo nesses órgãos e presença ou intensidade de sinais clínicos nos animais, mas verificaram associação entre alterações de caráter crônico – como deposição de colágeno – associadas a depleção de linfócitos, nos linfonodos que continham maiores contagens de parasitos. No mesmo estudo, em alguns dos animais infectados também não foram encontrados parasitos nos linfonodos, apesar de todos apresentarem parasitismo esplênico (LIMA et al., 2004). Outro grupo (SOLANO-GALLEGO et al., 2004), por sua vez, em um estudo realizado em uma área endêmica na Europa, verificou ausência de parasitos em amostras cutâneas positivas em PCR para DNA de *L. infantum*, de animais clinicamente sadios, e considerou que o achado poderia indicar a existência de uma população de cães imunocompetentes, que teriam uma pequena carga parasitária cutânea, sazonal, em decorrência de reinfecção. Esse equilíbrio seria suficiente para sustentar uma resposta de células T de memória, que os manteria livres de desenvolver doença visceral. Por outro lado, uma incompetência imunológica do hospedeiro permitiria variados graus de disseminação do parasito aos diferentes tecidos, como foi demonstrado por ALVAR e colaboradores (1997), que descrevem a presença de *Leishmania* em sítios incomuns, em cães com grave supressão da resposta imune. Esse fator pode influenciar diretamente a sensibilidade do diagnóstico parasitológico em amostras de diferentes tecidos.

De qualquer modo, um estudo correlacionando achados quantitativos de parasitismo na pele, nos linfonodos periféricos e nas vísceras de animais naturalmente infectados poderia auxiliar a esclarecer essas questões, incluindo

possíveis causas da baixa sensibilidade nos testes parasitológicos com aspirados de linfonodo, como a encontrada em nosso estudo.

No presente estudo, foi constatado, também, que a punção esplênica sob sedação foi mais bem tolerada pelos animais, em comparação com a punção no linfonodo, sob as mesmas condições. Esse aspecto foi observado tanto em animais clinicamente saudáveis como naqueles mais acometidos por sinais clínicos, com evidente debilidade física, mais propensos, conseqüentemente, a maior sensibilidade dolorosa, em decorrência de uma possível elevação nos níveis de TNF- α , já descrita em camundongos (ENGWERDA et al., 2002) e seres humanos (BARRAL-NETTO et al., 1991) com LV ativa.

Os resultados aqui descritos indicaram que a biópsia aspirativa no baço, e não no linfonodo, seria o método de escolha para obtenção de amostras para o diagnóstico parasitológico da LVC. Esta conclusão é consistente com a observação, feita em estudos histopatológicos de cães naturalmente infectados, de que a carga de amastigotas no baço é superior à que ocorre nos linfonodos (NATAMI et al., 2000). Entretanto, existe uma diferença entre nossos achados de sensibilidade no exame parasitológico feito a partir de aspirados de linfonodo e os achados de outros autores (MATHIS & DEPLAZES, 1995, REALE et al., 1999). Tais amostras têm sido consideradas satisfatórias no diagnóstico (MATHIS & DEPLAZES 1995) e no acompanhamento de animais com LVC (RIERA et al., 1999).

Pode-se aventar a possibilidade de haver diferenças reais na distribuição tecidual da *L. chagasi* entre baço e linfonodo. Alguns dos estudos reportando diagnóstico parasitológico baseado no exame de linfonodos são originários da Europa, onde a *L. infantum* é o agente infeccioso da LVC (MATHIS & DEPLAZES, 1995, REALE et al., 1999). Levantaram-se evidências de que *L. chagasi* e *L. infantum* sejam parasitos da mesma espécie (MAURICIO et al., 2000), introduzidos no continente americano durante a colonização européia. Dessa forma, uma das explicações possíveis para a diferença entre nossos dados e os dos autores que reportam alta sensibilidade em diagnóstico parasitológico com aspirados de linfonodos seria a existência de variações de cepas de *Leishmania* causadoras da LVC no Velho e no Novo Mundo. De fato, foram descritas variações na capacidade de disseminação e de promover lesões em diferentes sítios, como pele ou órgãos

internos, de acordo com o zimodema expresso por diferentes cepas de *L. infantum* (ALVAR et al., 1997, SULAHIAN et al., 1997) e *L. chagasi* (NOYES et al., 1997). Tais evidências indicam a necessidade de estudos mais aprofundados para identificar os fatores responsáveis pelas diferenças putativas na patogenia e no tropismo de diferentes cepas do parasito para diferentes tecidos do hospedeiro, incluindo mecanismos moleculares órgão-específicos de resposta imune envolvidos no desenvolvimento da infecção no cão. A importância desses estudos é reforçada pelo fato de que modificações cruciais na arquitetura e na composição das células do sistema imune dos órgãos linfóides na LV estão intrinsecamente ligadas à presença e à quantidade do parasito nesses sítios (MELBY et al., 2001; KAYE et al., 2004; LIMA et al., 2004).

As técnicas parasitológicas ainda são as que permitem os resultados mais confiáveis na rotina de diagnóstico confirmatório da LVC em muitos países. Provavelmente, a utilização de amostras de aspirado esplênico em técnicas mais sensíveis, como a PCR, aumentaria a sensibilidade desses métodos moleculares de diagnóstico. Isto tornaria o procedimento de aspiração esplênica útil em países onde a PCR é facilmente disponível.

O estudo seguinte destinou-se à avaliação da efetividade e da segurança da punção esplênica como método de rotina para obtenção de amostras adequadas a análises laboratoriais, para estudo de elementos celulares da resposta imune canina. O perfil clínico do grupo de animais estudado sobrepunha-se aos observados por outros autores em outras áreas endêmicas (POZIO et al., 1981; ABRANCHES et al., 1991; BLAVIER et al., 2001; FRANÇA-SILVA et al., 2003; BORJA-CABRERA et al., 2004). Entretanto, não houve correlação estatística entre aspectos como idade e gênero dos animais mais acometidos pela infecção em nosso estudo, divergindo dos achados de outros autores (CARDOSO et al., 2004), indicando a necessidade de estudos epidemiológicos mais aprofundados sobre LVC no Brasil.

Biópsias esplênicas com agulha fina são utilizadas no diagnóstico de leishmaniose em seres humanos (GUERIN et al., 2002) e cães (STRAUSS-AYALI et al., 2004). Menos freqüentemente, a técnica tem sido reportada no diagnóstico de outras doenças, principalmente de caráter linfoproliferativo / neoplásico, em cães

(STOCKHAUS et al., 1998; CHRISTOPHER, 2003), gatos (O'KEEFE & COUTO, 1987; HICKFORD et al., 2000) e seres humanos (KRAUS et al., 2001; FRITSCHER-RAVENS et al., 2003; ZEPPA et al., 2003). Estudos avaliando a segurança do procedimento, entretanto, são poucos e realizados apenas em seres humanos, nos quais o procedimento na maioria das vezes é conduzido sob monitoramento por ultrassonografia (BONIFACIO et al., 2000; CIVARDI et al., 2001; LAL et al., 2003).

O grupo de cães estudado no estudo presente apresentava uma heterogeneidade clínica que possibilitava uma alta probabilidade de ocorrência de eventos colaterais associados à punção esplênica, além de incluir cães clinicamente saudáveis. Um total de 257 procedimentos foi realizado nos 209 cães, uma vez que alguns deles foram submetidos a mais de uma punção, por participarem de estudos de acompanhamento de resposta à quimioterapia (dados não publicados). Desse total de punções, houve apenas três intercorrências: em dois animais houve punção acidental do intestino e, em um terceiro animal, houve formação de um hematoma cutâneo, no ponto de perfuração com a agulha.

Cabe ressaltar que o animal que desenvolveu o hematoma após a punção apresentava evidências clínicas e sorologia positiva para ehrlichiose. Ainda assim, não houve maiores consequências associadas ao procedimento, uma vez que o cão foi tratado para a infecção bacteriana e recuperou-se clinicamente, apesar de ter sido confirmada também a infecção por *Leishmania* na amostra de aspirado esplênico. Este evento pode assumir um caráter importante, uma vez que ambas as infecções, tanto por *Leishmania* quanto por *Ehrlichia*, estão associadas a alterações hemorrágicas e distúrbios da coagulação (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 2004). Como esse animal, havia 35 outros apresentando histórico e quadro clínico associado a ehrlichiose. Quaisquer evidências de anormalidade da coagulação estariam, a princípio, entre as contra-indicações principais à realização de punção esplênica, devido à possibilidade de acidente hemorrágico interno, como tem sido descrito em seres humanos (GUERIN et al., 2002; LAL et al., 2003). Foi de certa forma surpreendente, portanto, que não houvesse constatação de hemorragia interna em nenhum dos animais estudados, mesmo naqueles que apresentavam sangramento espontâneo, a exemplo de epistaxe, presença de petéquias cutâneas ou em mucosas e sangramento genital ou gengival. Os dois animais que sofreram

punção acidental de alças intestinais também não apresentaram quaisquer complicações nos oito dias que seguiram ao procedimento.

Assim, nossos achados sustentam a conclusão de que a técnica de punção esplênica com agulha fina é segura e factível, tanto em condições ambulatoriais, como em campo, uma vez que obtivemos 100% de sucesso nas 257 biópsias realizadas, considerando a ausência de complicações clinicamente relevantes nos 209 animais estudados. O procedimento pode ser considerado adequado para obtenção tanto de amostras para estudo parasitológico, como na obtenção de células esplênicas para estudo da resposta imune do cão, o que pode trazer informações importantes na compreensão da imunologia canina.

O uso de amostras de aspirado esplênico de cão no desenvolvimento de métodos para explorar o seu potencial informativo sobre aspectos etiológicos, alterações patológicas e de populações leucocitárias esplênicas, no animal vivo, foi o objeto do estudo seguinte. Foram padronizadas técnicas citoquímicas e imunocitoquímicas em preparações citológicas feitas a partir de amostras de aspirado esplênico e de sangue periférico, para estudo comparativo dos leucócitos. Animais saudáveis foram utilizados nos experimentos de padronização do método.

A pergunta inicial foi se amostras de baço, obtidas por punção aspirativa, produziram reprodutivamente material celular esplênico, com elementos que pudessem trazer informações sobre a resposta imune *in situ* no órgão. Para respondê-la, utilizamos seis cães adultos, saudáveis, os quais foram submetidos a punções esplênicas e coleta de sangue periférico. Por meio de purificação dos leucócitos com solução de hemólise e citocentrifugação, foi feita a contagem diferencial das células, coradas com corantes histológicos clássicos, para definição do perfil das populações de leucócitos, presentes nesses compartimentos. Alguns autores chamam a atenção para a pequena quantidade de material obtida na punção aspirativa do baço em seres humanos (ZEPPA et al., 2003), e para a perda de células durante o processamento imunoquímico em amostras biológicas de cães (TIPOLD et al., 1998). Objetivando minimizar tais problemas, nós comparamos produtos e protocolos diferentes, indicados para citocentrifugação. No nosso estudo, não houve diferenças significativas nas contagens ou na distribuição das populações celulares determinadas por técnicas baseadas na utilização de poli-L-lisina, Silane

ou Shandon. Com todos esses reagentes, foi obtido material suficiente para a realização de uma série de ensaios citoquímicos ou imunocitoquímicos do mesmo animal. Observou-se que houve melhor preservação da morfologia celular quando o fixador Shandon foi utilizado. Nesse caso, como propósito do estudo era a identificação precisa dos elementos celulares em contagens sob microscopia óptica, utilizamos o fixador Shandon em todas as análises subseqüentes. Em geral, cada aspirado rendeu um volume médio de 250 μL , o que resultava em cerca de 10^7 leucócitos purificados no total, suficiente para a confecção de cerca de 10 lâminas, cada uma com duas áreas contendo 5×10^5 células para análise. Os aspirados esplênicos apresentavam ainda uma característica peculiar que os distinguiam das amostras de sangue periférico: a presença de fragmentos de tecido, espalhados em meio a células dispersas individualmente. Esses fragmentos foram descritos como tendo o aspecto assumido, em preparações citológicas, pelo estroma da polpa vermelha, rico em macrófagos e células mesenquimais, enquanto as células dispersas, predominantemente linfócitos, representam a polpa branca (CHRISTOPHER, 2003). As diferenças significativas nas contagens diferenciais entre amostras de baço e de sangue permitiram a conclusão de que a biópsia esplênica com agulha fina possibilita a obtenção consistente de células esplênicas. Ainda, as amostras seriam úteis em várias aplicações, pois as características morfológicas foram mantidas. Essa constatação abre também perspectivas para a utilização dessas células em ensaios funcionais, como verificação da produção de citocinas e proliferação *in vitro*, em diferentes condições e sob diversos estímulos, aumentando a aplicabilidade das amostras no estudo da imunidade do cão.

Tendo determinado a boa qualidade das preparações citológicas, procurou-se verificar se estas poderiam ser utilizadas para análises de sub-populações por imunomarcagem com anticorpos monoclonais. O sucesso obtido com as técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase, realizadas com anticorpos monoclonais comerciais (anti-CD45RA e anti-CD45RB) e desenvolvidos em nossos laboratórios (AB6 e IH1, marcadores pan-leucocitário e de fagócitos, respectivamente) amplia a aplicabilidade do método de aspirado por agulha fina, seguido por citocentrifugação, ao estudo de alterações da celularidade esplênica. Esses resultados estão em acordo com os obtidos por pesquisadores em amostras de baço humanas (ZEPPA et al., 2003). A técnica de imunocitoquímica, com revelação utilizando

diaminobenzidina, foi particularmente eficaz na contagem diferencial de subpopulações de leucócitos esplênicos, permitindo a determinação das proporções dessas células.

O método padronizado, consistindo de (i) punção esplênica aspirativa, (ii) preparação citológica por purificação dos leucócitos e citocentrifugação, e (iii) contagem das células esplênicas marcadas com técnicas citoquímicas e imunoquímicas foi, então, aplicado em um estudo, no qual foram examinados dois grupos de cães, representando dois polos clínicos: um caracterizado por saúde clínica e negatividade em exames parasitológicos e sorológicos para LVC, e outro por doença clínica aberta, associada à infecção por *Leishmania*. Nesse estudo, o objetivo foi validar o método, como um protocolo para análise do baço do cão, por meio da demonstração de modificações induzidas pela infecção nos animais doentes. O grupo de animais infectados mostrava quadro clínico, perfil sérico de subclasses de imunoglobulinas G anti-*Leishmania*, indicando produção de anticorpos específicos e parasitismo condizentes com LVC ativa, de acordo com as características descritas por diversos autores (DEPLAZES et al., 1995; BORDOISEAU et al., 1997; NIETO et al., 1999; QUINNELL et al., 2003). A gravidade da doença nos animais incluídos neste estudo está compatível com a alta produção de anticorpos anti-*Leishmania* observada (ALMEIDA et al., 2005a; 2005b.. Uma associação negativa entre produção de anticorpos e imunidade na leishmaniose pode ser deduzida de resultados relatados por SMELT e colaboradores (2000), que demonstraram que em camundongos deficientes de células B ocorre formação eficiente de granulomas esplênicos, associados a um declínio rápido da carga parasitária esplênica e da esplenomegalia, diferentemente do que ocorre na infecção de animais intactos.

A separação dos leucócitos esplênicos das hemácias favoreceu o diagnóstico parasitológico por exame microscópico direto, por facilitar o encontro de formas amastigotas do parasito no interior dos fagócitos, em comparação com exames de rotina, usualmente feitos em esfregaços (dados não publicados). A coloração dos preparados celulares com HE e WRIGHT permitiu contagens tanto de parasitos quanto de células, o que cria a perspectiva de se poder fazer avaliações quantitativas. Com isso, torna-se possível estimar a carga parasitária esplênica nos

animais, indicando sua possível aplicação no monitoramento de intervenções terapêuticas e imunoproláticas experimentais. O aprimoramento da abordagem parasitológica pelo uso de ferramentas imunológicas, como a marcação dos parasitos por anticorpos monoclonais anti-*Leishmania*, nos preparados de leucócitos esplênicos por citocentrifugação, poderia facilitar e aumentar a sensibilidade da análise quantitativa do parasitismo.

Na medicina humana, a aspiração esplênica vem ganhando mais importância graças aos avanços nas técnicas auxiliares de imunodiagnóstico (ZEPPA et al., 2003). Os relatos referentes à utilização diagnóstica de aspirados esplênicos em medicina veterinária, citam principalmente a análise citopatológica de esfregaços corados por técnicas citoquímicas (O'KEEFE & COUTO, 1987; STOCKHAUS et al., 1998; HICKFORD et al., 2000; CHRISTOPHER, 2003; FRY et al., 2003). Ainda, os dados disponíveis sobre os componentes celulares no baço canino referem-se a achados obtidos em estudos feitos em secções de tecidos obtidas em necrópsias (TAFURI et al., 1996; AGUIAR et al., 2004; SANCHEZ et al., 2004; FALDYNA et al., 2005).

O perfil encontrado nas proporções de populações de leucócitos esplênicos e do sangue periférico nos dois grupos de cães saudáveis, tanto os animais domiciliados em área endêmica para LV quanto os de área não-endêmica, examinados no presente estudo, foi semelhante. Esse perfil pode representar um estado de equilíbrio fisiológico, envolvendo estímulo auto-antigênico e resposta imune a antígenos comuns. Mesmo nos casos em que foi constatada congestão esplênica em alguns dos animais, atribuível ao sedativo utilizado durante o procedimento de punção esplênica, a distribuição das populações celulares na análise dos preparados citológicos permaneceu característica do órgão. Chama a atenção um relato de achados comparativos entre estudos histopatológicos *versus* citológicos em baço de cão, sugerindo que a maioria das alterações esplênicas, focais ou difusas, pode ser diagnosticada de forma precisa em amostras obtidas por meio de biópsia aspirativa (CHRISTOPHER, 2003). Nas nossas análises, ficou evidente diferenças na razão neutrófilos / linfócitos entre amostras de baço e de sangue periférico dos animais saudáveis. A razão foi tipicamente menor nas amostras de baço,

que apresentaram maior proporção de linfócitos, permanecendo o padrão de diferença entre os compartimentos mesmo no grupo de animais doentes.

Quando as amostras de baço dos dois grupos de cães, sadios e doentes, foram comparadas, constatamos modificações significativas nos perfis das populações de leucócitos avaliadas: houve aumento nas contagens relativas de neutrófilos e macrófagos e redução nas contagens de linfócitos nas amostras dos cães portadores de LV. O aumento nas proporções de neutrófilos e, particularmente de macrófagos, nas amostras dos cães doentes, é concordante com a maioria dos quadros descritos de lesões histopatológicas na LVC, como hipertrofia e hiperplasia do sistema mononuclear fagocitário, associadas à intensificação da atividade fagocítica (TRYPHONAS et al., 1977; NATAMI et al., 2000) e aumento da presença de neutrófilos no baço (TAFURI et al., 2001). Alguns autores responsabilizam os neutrófilos pelo favorecimento e progressão da infecção por espécies cutaneotrópicas de *Leishmania* (RIBEIRO et al., 2004; van ZANDBERGEN et al., 2004). Mas, em estudos com infecção por *L. donovani* em modelos murinos, um aumento induzido dessas células pareceu contribuir para o controle e cura em estágios iniciais da infecção, por meio de um mecanismo associado à produção de reativos intermediários de oxigênio, em um processo regulado pelo TNF- α e caracterizado pela formação de granulomas bem estruturados no baço (SMELT et al., 2000). Um aumento relativo nas contagens de células fagocíticas em esfregaços de aspirados esplênicos também foi descrito na LV humana (HAQUE et al., 1992). Uma intensificação na atividade hematopoiética órgão-específica, gerada por elevação na expressão dos fatores estimuladores GM-CSF, G-CSF e M-CSF, foi descrita como sendo responsável pelo acúmulo de células progenitoras das linhagens granulocítica e macrófaga no baço, em modelo experimental murino de LV (COTTERELL et al., 2000). Tal fenômeno, consistente com nossos achados, pode ocorrer no baço de cães portadores de LV, uma vez que muitas das funções regulatórias que controlam a micro-arquitetura esplênica são aparentemente conservadas entre espécies (KAYE et al., 2004). Por outro lado, uma proliferação histiocítica reativa pode estar associada a distúrbios na imuno-regulação esplênica de modo geral. Este fenômeno foi apontado como responsável pelo aumento na proporção de neutrófilos em relação a infecções por agentes oportunistas (CHRISTOPHER, 2003).

A imunossupressão, que se instala na infecção por *Leishmania*, pode levar à susceptibilidade a outras infecções, fenômeno atribuído, entre outras possibilidades, a uma possível interferência inibidora sobre populações de linfócitos T de memória pré-existentes (KAYE et al., 2004). Ainda, a resposta imune eficaz contra a infecção por *Leishmania* foi associada a índices elevados de células T de memória no fígado murino, em comparação com proporções reduzidas dessas células no baço, onde a infecção assume um caráter progressivo (GOMES-PEREIRA et al., 2004). A redução nas contagens relativas de linfócitos, observada nas amostras de baço dos cães doentes no presente estudo, poderia ser um reflexo do quadro imunossupressivo envolvendo os linfócitos T, fenômeno bastante estudado na LVC (MARTINEZ-MORENO et al., 1993; PINELLI et al., 1994, 1999; MORENO et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2000; GUARGA et al., 2000, 2002; SANCHEZ et al., 2004). Estudos realizados com infecção canina natural por *L. infantum* mostram que as sub-populações de células T auxiliares CD4⁺ são as mais afetadas por anergia e apoptose induzidas pelo parasito, havendo uma relação direta entre redução dessas sub-populações no sangue e a gravidade do quadro clínico e maior capacidade infectiva para flebotomas nos cães (GUARGA et al., 2000).

Quando os preparados citológicos contendo leucócitos de aspirado esplênico e de sangue periférico foram analisados por imunocitoquímica por imunoperoxidase com os anticorpos monoclonais, ficaram evidentes diferenças entre as proporções das populações de células marcadas especificamente entre ambos os compartimentos, nos animais sadios do nosso estudo. Distinções fenotípicas na composição de leucócitos entre sangue e outros sítios já foram descritas em amostras de cão (DIRSCHERL et al., 1995; TIPOLD et al., 1998; OUT et al., 2002; SAKAI et al., 2003), porco (BULLIDO et al., 1997) e de seres humanos (NORRIS et al., 1998). A maior parte dos dados de imunofenotipagem de leucócitos em tecidos é referente a estudos por meio de citometria de fluxo, tanto para amostras humanas (SNEIGE et al., 1990; ZANDER et al., 1994; KALEEM et al., 2001), como de animais (TIPOLD et al., 1998; OUT et al., 2002; SAKAI et al., 2003; SANCHEZ, et al.; 2004; STEIN et al., 2004; WEISS 2004; FALDYNA et al., 2005). Não há publicações trazendo dados comparativos entre amostras de sangue e baço de cão.

Há relatos de análise por citometria de fluxo, feita em aspirados esplênicos humanos, mas os autores descrevem uma etapa prévia de filtração, antes de proceder à avaliação (ZANDER et al., 1994; BONIFACIO et al., 2000; ZEPPA et al., 2003). Entretanto, a remoção dos fragmentos de tecido estromal poderia talvez limitar a abrangência dos resultados, uma vez que há nesse material importantes elementos a merecer análise (CHRISTOPHER, 2003). Nas lâminas feitas com os leucócitos esplênicos por meio de citocentrifugação e avaliadas por imunocitoquímica, esses fragmentos foram preservados, o que permitiria sua análise. Existem, na literatura, relatos de dados comparativos entre análises feitas por imunocitoquímica e citometria de fluxo utilizando medula óssea (WEISS, 2004) e fluido cérebro-espinhal (TIPOLD et al., 1998) de cão, assim como linfonodo humano (ROBINS et al., 1994), demonstrando uma boa correlação entre as técnicas. Não há estudos similares envolvendo aspirados esplênicos de cão na literatura especializada. Os dados disponíveis sobre análise de aspirados de baço canino por imunocitoquímica restringem-se ao diagnóstico de linfoproliferações neoplásicas e não mencionam comparação entre técnicas (AFFOLTER & MOORE, 2002; FRY et al., 2003).

Os resultados da análise fenotípica por imunocitoquímica, comparando as amostras de sangue e de baço, mostraram que o baço apresenta proporções mais elevadas de células expressando CD45RA e mais reduzidas células marcadas pelos anticorpos monoclonais IH1 (contra moléculas específicas de fagócitos), AB6 (anti-CD45) e o marcador de CD45RB (clone YKIX 716), do que o sangue periférico nos animais sadios. Dadas as propriedades sinalizadoras das moléculas da família CD45 (COBBOLD & METCALFE, 1994), podemos atribuir as diferenças por nós verificadas nas proporções dos leucócitos exibindo as diferentes isoformas entre os compartimentos ao papel desempenhado por cada um desses compartimentos na resposta imune. A expressão de moléculas CD45RA ocorre em linfócitos não primados, em células T auxiliares secretoras de IFN- γ e em algumas células B (COBBOLD & METCALFE, 1994; ZUCKERMANN et al., 1998), enquanto a expressão de CD45RB é associada ao estado de ativação de células T CD4 positivas (VARGA & WELSH, 1996; SUTHERLAND et al., 2002; GOMES-PEREIRA et al., 2004). Pode haver coexistência de isoformas de CD45 na superfície da mesma célula, sendo os níveis de expressão dessas moléculas variáveis de acordo

com o estado de diferenciação do leucócito (ZUCKERMANN et al., 1998). Assim, as contagens relativamente elevadas de células expressando CD45RA, encontradas no baço dos nossos cães saudáveis, poderiam ser inerentes, por exemplo, às funções imuno-regulatórias do órgão, que atuaria como fonte de células pré-ativadas para outros compartimentos (GOMES-PEREIRA et al., 2004).

A análise comparativa das contagens relativas dos leucócitos marcados com os anticorpos monoclonais, entre amostras de animais doentes e saudáveis, revelou que houve um profundo decréscimo nas proporções de células CD45RA⁺ e um aumento de fagócitos e de células CD45⁺ e CD45RB⁺ no baço dos animais doentes. Reduções (MOORE et al., 1994; DE PAOLI et al., 1988; ZUCKERMANN et al., 1998; HOGENESCH et al., 2004; REIS et al., 2004; ORMANDY et al., 2005) ou elevações (PAPO et al., 1994; GESSL et al., 1995; TIPOLD et al., 1999; PAPPALARDO et al., 2001; OUT et al., 2002; CHATZIMANOLIS et al., 2004) nas proporções de células expressando essa molécula foram descritas em uma variedade de condições fisiológicas ou patológicas. Assim, as diferentes dinâmicas de expressão do CD45RA podem refletir as variações no perfil de resposta imune a estímulos diversos, uma vez que o fenótipo CD45RA⁺ é associado à condição de pré-ativação das células T (COBBOLD & METCALFE, 1994).

No caso específico de infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, há dados de redução nas proporções de leucócitos CD45RA⁺ no sangue, obtidos por citometria de fluxo (PIRMEZ et al., 1990; GUARGA et al., 2000; 2002). Os trabalhos constatando redução da expressão dessa molécula *in situ* restringem-se a secções de pele (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005) e tecido linfóide (SANCHEZ et al., 2004), no diagnóstico post-mortem da LVC. O presente estudo é pioneiro em avaliar a expressão de CD45RA em leucócitos de sangue e aspirados de baço na LVC, por meio de imunocitoquímica comparativa, e nossos achados são plenamente corroborados pelos dados desses outros autores. Explicações para tal redução poderiam incluir uma deleção de subgrupos de linfócitos T auxiliares, relacionada a apoptose induzida pelo parasito (POTESTIO et al., 2004), ou uma supressão dessas células, mediada por células dendríticas regulatórias, presentes no estroma esplênico, conforme demonstrado na LV murina experimental (SVENSSON et al., 2004). Há dados demonstrando que a terapia é capaz de restaurar os números

fisiológicos de células CD45RA no sangue de cães (GUARGA et al., 2002). Ainda, há descrição de expressão cíclica de CD45RA em linfócitos, de acordo com a natureza do estímulo (BELL & SPARSHOT, 1990; BULLIDO et al., 1997). A avaliação e o monitoramento da dinâmica de flutuações na expressão de moléculas CD45RA, em abordagens experimentais ou diagnósticas de uma série de doenças caninas, podem ser obtidos com exames seriais, o que seria permitido com a metodologia aqui descrita. Dados de necrópsia, nesse caso, permitiriam apenas uma avaliação isolada e pontual.

No grupo de cães doentes, as elevações encontradas nas contagens relativas de células expressando CD45 e CD45RB, particularmente nos aspirados esplênicos, podem ser associadas a uma condição de resposta imune ativa, devido à evolução da infecção, uma vez que a isoforma CD45RB é considerada um marcador de ativação de células T (COBBOLD & METCALFE, 1994; OUT et al., 2002; REIS et al., 2005). No modelo murino de LV, foi descrito um aumento de células CD45RB⁺ no baço (KAYE et al., 2004). Nesses animais, a resolução da infecção hepática foi ainda associada a uma predominância de células de memória derivadas de células T CD45RB ativadas provenientes do baço, onde a persistência das cargas parasitárias foi atribuída a uma reduzida proporção de células de memória (GOMES-PEREIRA et al., 2004). Em um estudo com células obtidas a partir de fragmentos de baço de cães portadores de LV, Sanchez e colaboradores (2004) encontraram também uma proporção elevada de linfócitos T efetores, identificados por meio de citometria de fluxo. No baço de camundongos infectados foi ainda descrito um aumento considerável de células T CD8⁺ ativadas, superando a sub-população de células virgens (GOMES-PEREIRA, et al., 2004). Tal achado sugere a possibilidade de que as contagens relativas elevadas de células CD45RB⁺ no baço dos cães doentes no presente estudo podem estar refletindo um aumento de células T CD8⁺ expressando esse fenótipo, além da esperada redução proporcional das células CD4⁺. De fato, parece não haver redução das proporções dos linfócitos T citotóxicos na LVC (GUARGA et al., 2000). Análises de aspirados esplênicos de cães infectados por *L. chagasi*, em condições clínicas variadas, utilizando anticorpos monoclonais específicos para moléculas CD4 e CD8 caninas, podem vir a trazer informações esclarecedoras sobre a dinâmica dessas sub-populações.

Nosso achado de elevação nas contagens relativas de fagócitos, marcados pelo anticorpo monoclonal IH1, nas amostras de baço do grupo de cães infectados, é concordante com as contagens diferenciais feitas com corantes citoquímicos clássicos nas amostras dos mesmos animais (HE e Wright). Tais dados são ainda equivalentes a alterações histopatológicas reportadas no curso da infecção por *Leishmania* (NATAMI et al., 2000; MELBY et al., 2001; TAFURI et al., 2001; KAYE et al., 2004), e a achados de elevação de células positivas para CD11c no baço de cães com LV (SANCHEZ et al., 2004). Comparativamente, o aporte intenso no baço de neutrófilos e macrófagos, resultando nas elevações de proporções de fagócitos, é detalhadamente descrito em modelos murinos de LV (KAYE et al., 2004). A esses fagócitos são atribuídas funções críticas na evolução da resposta imuno-inflamatória ao parasito no baço, incluindo produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, fagocitose e apresentação de antígenos, e secreção de quimiocinas recrutadoras de linfócitos (SMELT et al., 2000).

Já foi demonstrado experimentalmente que eventos imunológicos em uma fase precoce da infecção por *Leishmania* determinam o curso da resposta imune para uma condição de resistência ou susceptibilidade (MELBY et al., 2001; ENGWERDA et al., 2004). Na infecção de camundongos susceptíveis, o baço é o sítio principal de infecção crônica pelos parasitos (ENGWERDA et al., 2004), oferecendo um ambiente propício para a apresentação de antígenos aos linfócitos, uma vez que os macrófagos presentes na zona marginal e circundando os folículos linfóides são responsáveis pela fagocitose das formas parasitárias trazidas pelo sangue (ENGWERDA & KAYE, 2000). As alterações que se seguem na micro-arquitetura do baço, particularmente associadas a atrofia da polpa branca e a infiltração macrofágica disseminada, parecem ser intrinsecamente dependentes da ação do TNF- α , tanto em camundongos, quanto em seres humanos. Esse efeito do TNF- α tem um aspecto paradoxal, uma vez que a citocina está também associada a uma resposta imune organizada e efetiva no fígado murino, levando ao desaparecimento do parasito nesse órgão (ENGWERDA et al., 2002; KAYE et al., 2004). O mesmo fenômeno pode ocorrer no cão infectado, uma vez que há uma série de concordâncias entre os achados patológicos descritos na LV entre esses três hospedeiros. A esplenomegalia é um achado freqüente em cães naturalmente infectados pelo parasito (SLAPPENDEL et al., 1988; CIARAMELLA et al., 1997;

publicação 6.2 desta tese), da mesma forma que em seres humanos (ZIJLSTRA & EL-HASSAN, 2001). A esplenomegalia também acompanha a persistência da infecção no baço de camundongos (KAYE et al., 2004). A desorganização e a perda dos centros germinais, descritas na LV murina (ENGWERDA & KAYE, 2000) podem ser o fator determinante da redução nas proporções de células CD45RA+, particularmente nas amostras de aspirado esplênico nos cães infectados. Da mesma forma, a descrição da expansão das células macrofágicas, associada ao aumento da atividade hematopoiética na LV murina (COTTEREL et al., 2000; ENGWERDA et al., 2004), encontra equivalência nos achados de elevação nas proporções de células fagocíticas, identificada neste trabalho de tese pelas técnicas de coloração química e imunoquímica nas amostras de baço dos cães infectados.

Os dados apresentados neste estudo são os primeiros a descrever e quantificar comparativamente as populações e sub-populações de leucócitos de cães, utilizando amostras de aspirado esplênico, obtidas de animais sadios e infectados com *L. chagasi*, por meio de técnicas citoquímicas e imunocitoquímicas. O conhecimento da resposta imune *in situ* do baço do cão é fundamental, uma vez que suas funções especializadas diferem das do sangue e de outros órgãos linfóides, no curso da infecção. A compreensão dos componentes celulares órgão-específicos pode permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficientes na prevenção e na terapêutica da doença, voltadas para a ativação ou modulação destas células. Além de poder eventualmente facilitar estudos de imuno-regulação esplênica e de mecanismos patogênicos envolvidos na LVC, o método por nós padronizado abre a perspectiva de aplicação em outras doenças caninas, particularmente aquelas com quadro equivalente em seres humanos. No caso particular da leishmaniose, os animais susceptíveis encontram-se imuno-deprimidos e são melhores transmissores do parasito a flebótomos, devido à sua maior carga parasitária (TRAVI et al., 2001; GUARGA et al., 2002). Considerando o papel central do baço na definição do curso da infecção, o conhecimento amplo das particularidades da resposta imune nesse órgão, na LVC, é fundamental para o desenvolvimento de reagentes e protocolos voltados para o controle da infecção, como vacinas e imunoterápicos.

8. CONCLUSÕES

1. Amostras de aspirado esplênico possibilitaram um diagnóstico parasitológico mais sensível da LVC, em comparação com amostras de aspirado de linfonodo poplíteo, por meio de cultivo e avaliação sob microscopia óptica.
2. A técnica de biópsia esplênica com agulha fina mostrou ser segura, prática, factível e passível de ser repetida em cães com uma grande diversidade de condições clínicas, associadas ou não à LVC, permitindo amostras adequadas para citologia.
3. As técnicas de coloração citoquímica de amostras de aspirado esplênico mostraram ser adequadas ao diagnóstico parasitológico da LVC, com possível valor prognóstico, devido à possibilidade de quantificação da carga parasitária no baço.
4. As técnicas descritas e padronizadas para análise citoquímica e imunocitoquímica dos leucócitos esplênicos permitiram a distinção do perfil de populações celulares características de diferentes compartimentos – baço e sangue periférico – de animais sadios e portadores de LV.
5. O baço de cães portadores de LV ativa tem maiores contagens relativas de células CD45RB+, CD45+ (marcados pelo AB6) e fagócitos (marcados pelo IH1) e menores de células CD45RA+ e de linfócitos do que o baço dos animais sadios, consistente com um estado de ativação celular e com o descrito aumento de células da linhagem fagocítico-mononuclear na LV.

CONCLUSÃO GERAL

O método padronizado descrito neste trabalho é aplicável a análises seqüenciais de variações de sub-populações celulares no baço, possibilitando o estudo de esplenócitos de cães vivos, de forma segura e pouco invasiva, e permitindo a obtenção de dados sobre alterações imunológicas e sobre o parasitismo esplênico na LVC.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar avaliações mais extensivas do método imunocitoquímico, utilizando aspirados esplênicos de cão, comparando-o com outras técnicas de imunofenotipagem de leucócitos, como a citometria de fluxo, e utilizando um número maior de animais saudios e com diferentes condições clínicas de LVC.

- Comparar os resultados de imunofenotipagem e de análise citológica obtidos em preparações citocentrifugadas de aspirado esplênico canino com os obtidos (1) em cortes histológicos, (2) em preparações citocentrifugadas de macerado de baço e (3) em aspirados de medula óssea e de linfonodo.

- Proceder a análises comparativas com maior número de animais saudios e infectados, utilizando outros anticorpos monoclonais anti-leucócitos de cão, a exemplo de anti-CD4, CD8, CD44, CD5 e outros, comerciais ou disponíveis na Fundação Oswaldo Cruz, Bahia (Aguiar e colaboradores, 2004).

- Testar o método padronizado em outras condições patológicas caninas, a exemplo de neoplasias, outras infecções e doenças autoimunes.

- Aplicar o método padronizado na avaliação de células envolvidas na resposta imune no baço de cães portadores de leishmaniose visceral, sob intervenção terapêutica com agentes quimioterápicos e candidatos a imunoterápicos.

- Testar a viabilidade da utilização dos leucócitos esplênicos obtidos por punção aspirativa no diagnóstico de LVC por meio de PCR e em testes funcionais das células esplênicas, como linfoproliferação sob diversos estímulos e avaliação de perfis de produção de citocinas *in vitro* e *ex-vivo*.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P., SANTOS-GOMES, G., RACHAMIN, N., CAMPINO, L., SCHNUR, L.F., JAFFE, C.L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. Parasite Immunol., v. 13, p. 537-550. 1991.
- AFFOLTER, V.K., MOORE, P.F. 2002. Localized and disseminated histiocytic sarcoma of dendritic cell origin in dogs. Veterinary Pathology, v. 39, p. 74-83. 2002.
- AGUIAR, P.H., BORGES DOS SANTOS, R.R., LIMA, C.A., RIOS DE SOUSA, GOMES, H., LARANJEIRA, D.F., SANTOS, P.M., BARROUIN-MELO, S.M., CONRADO DOS-SANTOS, W.L., PONTES-DE-CARVALHO, L. Production of monoclonal antibodies against canine leukocytes. Hybridoma and Hybridomics 23, 127-132. 2004.
- ALMEIDA, M.A.O., JESUS, E.E.V., SOUSA-ATTA, M.L.B., ALVES, L.C., BERNE, M.E.A., ATTA, A.M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 106, p. 151-158. 2005a.
- ALMEIDA, M.A.O., JESUS, E.E.V., SOUSA-ATTA, M.L.B., ALVES, L.C., BERNE, M.E.A., ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet. Parasitology, v. 127, p. 227-232. 2005b.
- ALVAR, J., CANAVATE, C., GUTIERREZ-SOLAR, B., JIMENEZ, M., LAGUNA, F., LOPEZ-VELEZ, R., MOLINA, R., MORENO, J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev, v.10, p. 298-319. 1997.
- AMUSATEGUI, I., SÁINZ, A., RODRÍGUEZ, F., TESOURO, M.A. Tratamiento de la leishmaniosis canina. Med. Vet., v. 12, n. 5, p. 289-298; n. 6, p. 373-383. 1995.
- ASHFORD, D.A., BOZZA, M., FREIRE, M., MIRANDA, J.C., SHERLOCK, I., EULALIO, C., LOPES, U., FERNANDES, O., DEGRAVE, W., BARKER, R.H.Jr. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 53, p. 251-255. 1995.
- ATO, M., STÄGER, S., ENGWERDA, C., KAYE, P. Defective CCR α expression on dendritic cell contributes to the development of visceral leishmaniasis. Nature Immunology, v. 3, p. 1185-1191, 2002.
- BADARÓ, R., JONES, T.C., LORENÇO, R., CERF, B.J., SAMPAIO, D., CARVALHO, E.M., ROCHA, H., TEIXEIRA, R., JONHSON, W.D.Jr. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. Journal of Infectious Diseases, v. 134, p. 639-649. 1986.
- BARROUIN-MELO, S.M., LARANGEIRA, D.F., TRIGO, J., AGUIAR, P.H.P., DOS-SANTOS, W.L.C., PONTES-DE-CARVALHO, L. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, p. 195-197. 2004.
- BELL, E.B., SPARSHOTT, S.M. Interconversion of CD45R subsets of CD4 T cells *in vivo*. Nature, v. 348, p. 163-166. 1990.
- BARRAL-NETTO, M., BADARO, R., BARRAL, A., ALMEIDA, R.P., SANTOS, S.B., BADARO, F., PEDRAL-SAMPAIO, D., CARVALHO, E.M., FALCOFF, E., FALCOFF, R.

- Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, v. 163, p. 853-857. 1991.
- BERRAHAL, F., MARY, C., ROZE, M., BERENGER, A., ESCOFFIER, K., LAMOUREUX, D., DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 55, p. 273-277. 1996.
- BLAVIER, A., KEROACK, S., DENEROLLE, P., GOY-THOLLOT, I., CHABANNE, L., CADORE, J.L., BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, v. 162, p. 108-120. 2001.
- BONIFACIO, A., GOLDBERG, R.E.A., PATTERSON, B.J., HAIDER, M. Flow cytometry-enhanced fine needle aspiration biopsy of the spleen. *Canadian Association of Radiology Journal*, v. 51, p. 158-162, 2000.
- BOURDOISEAU, G., BONNEFONT, C., HOAREAU, E., BOEHRINGER, C., STOLLE, T., CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 59, p. 21-30. 1997.
- BORJA-CABRERA, G.P., CRUZ-MENDES, A., PARAGUAI-DE-SOUZA, E., HASHIMOTO-OKADA, L.Y., TRIVELLATO, F.A., KAWASAKI, J.K., COSTA, A.C., REIS, A.B., GENARO, O., BATISTA, L.M., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, v. 22, p. 2234-2243. 2004.
- BRADLEY, D.J., KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 30, p. 119-129. 1977.
- BULLIDO, R., GOMEZ DEL MORAL, M., DOMENECH, N., ALONSO, F., EZQUERRA, A., DOMINGUEZ, J. Monoclonal antibodies to a high molecular weight isoform of porcine CD45: biochemical and tissue distribution analyses. *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 56, p. 151-162. 1997.
- BYRNE, K.M., REINHART, G.A., HAYEK, M.G. Standardized flow cytometry gating in veterinary medicine. *Methods in Cell Science*, v. 22, p. 191-198. 2000a.
- BYRNE, K.M., KIM, H.W., CHEW, B.P., REINHART, G.A., HAYEK, M.G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 73, p. 167-182. 2000b.
- CABRAL, M., O'GRADY, J., ALEXANDER, D. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.*, v. 14, p. 53. 1992.
- CARDOSO, L., RODRIGUES, M., SANTOS, H., SCHOONE, G.J., CARRETA, P., VAREJÃO, E., VAN BENTHEM, B., AFONSO, M.O., ALVES-PIRES, C., SEMIAO-SANTOS, S.J., RODRIGUES, J., SCHALLIG, H.D. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*, 121, 21-32. 2004.

- CHABANNE, L., BONNEFONT, C., BERNAUD, J., RIGAL., D. Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat). Methods in Cell Science, v. 22, p. 199-207. 2000.
- CHATZIMANOLIS, N., KRAUS, J., BAUER, R., ENGELHARDT, B., BREGENZER, T., KUEHNE, B.S., TOFIGHI, J., LASKE, C., STOLZ, E., BLAES, F., VOIGT, K., TRAUPE, H., KAPS, M., OSCHMANN, P. CD45RA+ ICAM-3+ lymphocytes in interferon-beta1b-treated and -untreated patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Acta Neurol. Scand., v. 110, p. 377-385. 2004.
- CHRISTOPHER, M.M. Cytology of the spleen. Vet. Clin. Small Anim., v. 33, p. 135-152. 2003.
- CIARAMELLA, P., OLIVA, G., DELUNA, R., GRADONI, L., AMBROSIO, R., CORTESE, L., SCALONE, A., PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniosis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Veterinary Records, v. 141, p. 539-543. 1997.
- CIVARDI, G., VALLISA, D., BERTE, R., GIORGIO, A., FILICE, C., CAREMANI, M., CATURELLI, E., POMPILI, M., DE-SIO, I., BUSCARINI, E., CAVANNA, L. Ultrasound-guided fine needle biopsy of the spleen: high clinical efficacy and low risk in a multicenter Italian study. American Journal of Hematology, v. 67, p.93-99. 2001.
- COBBOLD, S., METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). Tissue Antigens, v. 43, p. 137-154. 1994.
- COSTA, C.H.N., PEREIRA, H.F., ARAÚJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. Rev. Saúde Públ. - S. Paulo, v. 24, p. 361-372. 1990.
- COTTERELL, S.E., ENGWERDA, C.R., KAYE, P.M. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. Infect. Immun., v. 68, p. 1840-1848. 2000.
- COURTENAY, O., SANTANA, E.W., JOHNSON, P.J., VASCONCELOS, I.A., VASCONCELOS, A.W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 5, p. 498-502. 1996.
- DARBES, J., MAJZOUB, M., HERMANNNS, W. Evaluation of cross-reactivity between human and feline or canine leukocyte antigens using commercially available antibodies. J. Vet. Diag. Invest., v. 9, p. 94-97. 1997.
- DE PAOLI, P., BATTISTIN, S., SANTINI, G.F. Age-related changes in human lymphocyte subsets: progressive reduction of the CD4 CD45R (suppressor inducer) population. Clin Immunol Immunopathol., v. 48, p. 290-296. 1988.
- DEANE, L.M., DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. Hospital, v. 47, p.75-87. 1955.
- DEPLAZES, P., SMITH, N.C., ARNOLD, P., LUTZ, H., ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. Parasite Immunol., v. 17, p. 451-458. 1995.

- DIRSCHERL, P., BEISKER, W., KREMMER, E., MIHALKOV, A., VOSS, C., ZIESENIS, A. Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes. Vet Immunol Immunopathol., v. 48, p. 1-10. 1995.
- DUNAN, FROMMEL D, MONJOUR L, OGUNKOLADE BW, CRUZ A, QUILICI M. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis. Parasite Immunol., v. 11, p. 397-402. 1989.
- DYE, C. Leishmaniasis epidemiology: the theory catches up. Parasitology, v. 104, p. S7-S18. 1992.
- ENGWERDA, C.R., KAYE, P.M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. Immunology Today, v. 21, p. 73-78. 2000.
- ENGWERDA, C.R., ATO, M., COTTERELL, S.E., MYNOTT, T.L., TSCHANNERL, A., GORAK-STOLINSKA, P.M., KAYE, P.M. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. Am. J. Pathol., v. 161, p. 429-437. 2002.
- ENGWERDA, C.R., ATO, M., KAYE, P.M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Trends Parasitol., v. 20, p. 524-530. 2004.
- FALDYNA, M., LEVÁ, L., KNÖTIGOVÁ, P., TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 82, p. 23-37. 2001.
- FALDYNA, M., SINKORA, J., KNÖTIGOVÁ, P., LEVÁ, L., TOMAN, M. Lymphatic organ development in dogs: major lymphocyte subsets and activity. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 104, p. 239-247. 2005.
- 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, v. 28, p. 36-44. 2000.
- FERRER, L., AISA, M.J., ROURA, X., PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Veterinary Records, v. 136, p. 514-516. 1995.
- FRANÇA-SILVA, J.C., DA-COSTA, R.T., SIQUEIRA, A.M., MACHADO-COELHO, G.L., DA-COSTA, C.A., MAYRINK, W., VIEIRA, E.P., COSTA, J.S., GENARO, O., NASCIMENTO, E. 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.
- FRITSCHER-RAVENS, A., MYLONAKI, M., PANTES, A., TOPALIDIS, T., THONKE, F., SWAIN, P. Endoscopic ultrasound-guided biopsy for the diagnosis of focal lesions of the spleen. Am. J. Gastroenterol., v. 98, p. 1022-1027. 2003.
- FRY, M.M., VERNAU, W., PESAVENTO, P.A., BROMEL, C., MOORE, P.F. Hepatosplenic lymphoma in a dog. Vet. Pathol., v. 40, p. 556-562. 2003.
- GENARO, O., COSTA, C.A., BREYNER, E.T., REIS, A.B., TROPIA, A.R., TAFURI, W.L., DIAS, M., MAYRINK. The course of experimental visceral leishmaniasis in dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 87, supl. II, p. 105. 1992.

- GESSEL, A., WILFING, A., AGIS, H., STEINER, G., CZERNIN, S., BOLTZ-NITULESCU, G., VIERHAPPER, H., WALDHAUSL, 1995. Activated naive CD4+ peripheral blood T cells in autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 5, 117-125.
- GOMES-PEREIRA, S., RODRIGUES, O.R., SANTOS-GOMES, G.M. Dynamics of CD62L/CD45RB CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets in hepatic and splenic tissues during murine visceral leishmaniasis. *Immunol. Lett.*, v. 95, p. 63-70. 2004.
- GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for canine *Leishmania* vaccine. *Vet. Parasitol.*, v. 100, p. 87-103. 2001.
- GREELEY, E.H., BALLAM, J.M., HARRISON, J.M., KEALY, R.D., LAWLER, D.F., SEGRE, M. The influence of age and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador Retriever dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 82, p. 57-71. 2001.
- GUARGA, J.L., MORENO, J., LUCIENTES, J., GRACIA, M.J., PERIBANEZ, M.A., ALVAR, J., CASTILLO, J.A. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res. Vet. Sci.* v. 69, p. 249-253. 2000.
- GUARGA, J.L., MORENO, J., LUCIENTES, J., GRACIA, M.J., PERIBÁÑEZ, M.A., CASTILLO, J.A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 88, p. 13-20. 2002.
- GUERIN, P.J., OLLIARO, P., SUNDAR, S., BOELAERT, M., CROFT, S.L., DESJEUX, P., WASUNNA, M.K., BRYCESON, A.D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 494-501. 2002.
- GUGLIELMINO, R., MINISCALCO, B., TARDUCCI, A., BORGARELLI, M., RIONDATO, F., ZINI, E., BORRELLI, A., BUSSADORI, C. Blood lymphocyte subsets in canine idiopathic pericardial effusion. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 98, p. 167-173. 2004.
- HAQUE, I., HAQUE, M.Z., KRISHNANI, N., SRIVASTAVA, S.P., KHAN, E.M. Fine needle aspiration cytology of the spleen in visceral leishmaniasis. *Acta Cytol.*, v. 37, p. 73-76. 1993.
- HICKFORD, F.H., STOKOL, T., VANGESSEL, Y.A., RANDOLPH, J.F., SCHERMERHORN, T. Monoclonal immunoglobulin G cryoglobulinemia and multiple myeloma in a domestic shorthair cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 217, p. 1029-1033, 1007-1008. 2000.
- HOGENESCH, H., THOMPSON, S., DUNHAM, A., CEDDIA, M., HAYEK, M. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 97, p. 77-85. 2004.
- JERONIMO, S.M.B., OLIVEIRA, R.M., MACKAY, S., COSTA, R.M., SWEET, J., NASCIMENTO, E.T., LUZ, K.G., FERNANDES, M.Z., JERNIGAN, J., PEARSON, R.D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 88, p. 386-388. 1994.
- JONES, M., CORDELL, J.L., BREYERS, A.D., TSE, A.G.D., MASON, D.Y. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive antibodies. *J. Immunol.*, v. 150, p. 5429-5435. 1993.

- KALEEM, Z., WHITE, G., VOLLMER, R.T. Critical analysis and diagnostic usefulness of limited immunophenotyping of B-Cell Non-Hodgkin lymphomas by flow cytometry. American Journal of Clinical Pathology, v. 115, p. 136-142. 2001.
- KAYE, P.M., SVENSSON, M., ATO, M., MAROOF, A., POLLEY, R., STAGER, S., ZUBAIRI, S., ENGWERDA, C.R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunol. Rev., v. 201, p. 239-253. 2004.
- KOLE, L., DAS, L., DAS, P.K. Synergistic effect of interferon- γ and mannosylated liposome-incorporated doxorubicin in the therapy of experimental visceral leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases, v. 180, p. 811-820. 1999.
- KRAUS, M.D., FLEMING, M.D., VONDERHEIDE, R.H. The spleen as a diagnostic specimen: a review of 10 years' experience at two tertiary care institutions. Cancer., v. 91, p. 2001-2009. 2001.
- LAL, A., ARIGA, R., GATTUSO, P., NEMCEK, A.A., NAYAR, R. Splenic fine needle aspiration and core biopsy. A review of 49 cases. Acta Cytologica 47, 951-959. 2003.
- LASRI, S., SAHIBI, H., SADAK, A., JAFFE, C.L., RHALEM, A. Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. Vet Res., v. 30, p. 441-449. 1999.
- LI, J., SUTTERWALA, S., FARRELL, J.P. Successful therapy of chronic, nonhealing murine cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate and gamma-interferon depends on continued interleukin-12 production. Infection and Immunity, v. 65, p. 3225-3230. 1997.
- LIEW, F.Y., O'DONNELL, C.A. Immunology of leishmaniasis. Advances in Parasitology, v. 32, p. 161-259. 1993.
- 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, v. 92, p. 43-53. 2004.
- LISHNER, M., LANG, R., HAMLET, Y., HALPH, E., STEINER, Z., RADNAY, J., RAVID, M. Fine needle aspiration biopsy in patients with diffusely enlarged spleens. Acta Cytol., v. 40, p. 196-198. 1996.
- LOWENTAL, J.W., O'NEIL, T.E., DAVID, A., STROM, G., ANDREW, M.E. Cytokine therapy: a natural alternative for disease control. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.72, p. 183-188. 1999.
- MAYRINK, W., GENARO, O., SILVA, J.C., DA-COSTA, R.T., TAFURI, W.L., TOLEDO, V.P., DA-SILVA, A.R., REIS, A.B., WILLIAMS, P., DA-COSTA, P.W. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections. in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz., v. 9, p. 695-697. 1996.
- MAEKAWA, Y., HIMENO, K., ISHIKAWA, H., HISAEDA, H., SAKAI, T., DAINICHI, T., ASAO, T., GOOD, R.A., KATUNUMA, N. Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. The Journal of Immunology, v. 161, p. 2120-2127. 1998.
- MARTINEZ-MORENO, A., MARTINEZ-CRUZ, M.S., BLANCO, A., HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol., v. 51, p. 49-59. 1993.

- MARZOCHI, M.C.A., MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging antrozoosis and possibilities for their control. Cad. Saúde Públ., v. 10, p. 359–375. 1994.
- MAURICIO, I.L., STOTHARD, J.R., MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol. Today, v. 16, p. 188-189. 2000.
- MBOW, M.L., BLEYENBERG, J.A., HALL, L.R., TITUS, R.G. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. The Journal of Immunology, v. 161, p. 5571-5577. 1998.
- MELBY, P.C., TABARES, A., RESTREPO, B.I., CARDONA, A.E., MCGUFF, H.S., TEALE, J.M. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control infection. Experimental Parasitology, v. 99, p. 15-25. 2001.
- MENON, J.N., BRETSCHER, P.A. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to *Leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. Eur. J. Immunol., v. 28, p. 4020-4028. 1998.
- MICHALIK, M.S.M., GENARO, O., CHAVES, K.M., COSTA, C.A., MELO, M.N., MAYRINK, W. Expansão da leishmaniose visceral em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 25, p. 85. 1992.
- MOHEBALI, M., KHAMESIPOUR, A., MOBEDI, I., ZAREI, Z., HASHEMI-FESHARKI, R. Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. Vaccine., v. 22, p. 4097-4100. 2004.
- MOORE, P.F., OLIVRY, T., NAYDAN, D., 1994. Canine cutaneous epitheliotropic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T cells. Am. J. Pathol., v. 144, p. 421-429. 1994.
- MORENO, J., NIETO, J., CHAMIZO, C., GONZÁLEZ, F., BLANCO, F., BARKER, D.C., ALVAR, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis, before and after chemotherapy. Veterinary immunology and Immunopathology, v. 71, p. 181-195. 1999.
- MORENO, J., ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol., v. 18, p. 399-405. 2002.
- NABORS, G.S., NOLAN, T., CROOP, W., LI, J., FARRELL, J. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c X C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. Parasite Immunology, v. 17, p. 569-579. 1995.
- NASCIMENTO, M.D.S.B., BANDEIRA, K.P., FILHO, M.S., AHID, S., BARROS-BEZERRA, G.F., CASTRO-ALVIM, M., CARVALHO-BASTOS, O., SILVA-PARANHOS, M., SADIGURSKY, M. Observações preliminares sobre a leishmaniose visceral canina (LVC) na ilha de São Luís, MA: aspectos soropidemiológicos, clínicos e histopatológicos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 25, p. 85-86. 1992.
- NATAMI, A., SAHIBI, H., LASRI, S., BOUDOUMA, M., GUESSOUSS-IDRISSI, N., RHALEM, A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. Vet. Res., v. 31, p. 355-363. 2000.

- NEOGY, A.B., VOULDOUKIS, J., COSTA, J.M.; MONJOUR, L. Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniasis. Veterinary Parasitology, v. 54, p. 367-373. 1994.
- NIETO, C.G., GARCIA-ALONSO, M., REQUENA, J.M., MIRON, C., SOTO, M., ALONSO, C., NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 67, p. 117-130. 1999.
- NORRIS, S., COLLINS, C., DOHERTY, D.G., SMITH, F., MCENTEE, G., TRAYNOR, O., NOLAN, N., HEGARTY, J., O'FARRELLY, C. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. Journal of Hepatology, v. 28, p. 84-90. 1998.
- NOYES, H., CHANCE, M., PONCE, C., PONCE, E., MAINGON, R. *Leishmania chagasi* genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. Exp. Parasitol., v. 85, p. 264-273. 1997.
- OGUNKOLADE, B.W., VOULDOUKIS, I., FROMMEL, D., DAVOUST, B., RHODES-FEUILLETTE, A., MONJOUR, L. Immunization of dogs with a *Leishmania infantum*-derived vaccine. Vet Parasitol., v. 28, p. 33-41. 1988.
- O'KEEFE, D.A., COUTO, C.G. Fine-needle aspiration of the spleen as an aid in the diagnosis of splenomegaly. J Vet Intern Med., v. 1, p. 102-109. 1987.
- OLIVEIRA, G.G.S., SANTORO, F., SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 88, p. 243-248. 1993.
- ORMANDY, L.A., HILLEMANN, T., WEDEMEYER, H., MANN, M.P., GRETEN, T.F., KORANGY, F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Research, v. 65, p. 2457-2464. 2005.
- OTANI, I., NIWA, T., TAJIMA, M., ISHIKAWA, A., WATANABE, T., TSUMAGARI, S., TAKEISHI, M., KANAYAMA, K. CD56 is expressed exclusively on CD3+ T lymphocytes in canine peripheral blood. J. Vet. Med. Sci., v. 64, p. 441-444. 2002.
- OUT, T.A., WANG, S.Z., RUDOLPH, K., BICE, D.E. Local T-cell activation after segmental allergen challenge in the lungs of allergic dogs. Immunology, v. 105, p. 499-508. 2002.
- OZBEL, Y., OSKAM, L., OZENSOY, S., TURGAY, N., ALKAN, M.Z., JAFFE, C.L., OZCEL, M.A. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. Acta Trop., v. 74, p. 1-6. 2000.
- PANARO, M.A., ACQUAFREDDA, A., LISI, S., LOFRUMENTO, D.D., MITOLO, V., SISTO, M., FASANELLA, A., TROTTA, T., BERTANI, F., CONSENTI, B., BRANDONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v. 24, p. 187-195. 2001.
- PAPADOGIANNAKIS, E.I., KOUTINAS, A.F., SARIDOMICHELAKIS, M.N., VLEMMAS, J., LEKKAS, S., KARAMERIS, A., FYTIANOU, A., 2005. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). Vet. Immunol. Immunopathol., v. 104, p. 227-237. 2005.

- PAPO, T., PIETTE, J.C., LEGAC, E., FRANCES, C., GRENOT, P., DEBRE, P., GODEAU, P., AUTRAN, B. T lymphocyte subsets in primary antiphospholipid syndrome. Journal of Rheumatology, v. 21, p. 2242-2245. 1994.
- PAPPALARDO, B.L., BROWN, T.T., TOMPKINS, M., BREITSCHWERDT, E.B. Immunopathology of *Bartonella vinsonii (berkhoffii)* in experimentally infected dogs. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 83, p. 125-147. 2001.
- PARANHOS-SILVA, M., FREITAS, L.A.R., SANTOS, W.C., GRIMALDI JR, G., PONTES-DE-CARVALHO, L.C., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. Am J. Trop. Med. Hyg., v. 51, p. 39-44. 1996.
- PARANHOS-SILVA, M., NASCIMENTO, E.G., MELRO, M.C., OLIVEIRA, G.G., DOS SANTOS, W.L., PONTES-DE-CARVALHO, L.C., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for american visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. Acta Trop., v. 69, p. 75-83. 1998.
- PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., DEL-REAL, G., RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect. Immun., v. 62, p. 229. 1994.
- PINELLI, E., GONZALO, R.M., BOOG, C.J., RUTTEN, V.P., GEBHARD, D., DEL-REAL, G., RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. Eur. J. Immunol., v. 25, p. 1594-1600. 1995.
- PINELLI, E., RUTTEN, V.P., BRUYSTERS, M., MOORE, P.F., RUITENBERG, E.J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. Infect Immun., v. 67, p. 237-243. 1999.
- PIRMEZ, C., COOPER, C., PAES-OLIVEIRA, M., SCHUBACH, A., TORIGIAN, V.K., MODLIN, R.L., 1990. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. J. Immunol., v. 145, p. 3100-3104. 1990.
- POTESTIO, M., D'AGOSTINO, P., ROMANO, G.C., MILANO, S., FERLAZZO, V., AQUINO, A., DI BELLA, G., CARUSO, R., GAMBINO, G., VITALE, G., MANSUETO, S., CILLARI, E. CD4+ CCR5+ and CD4+ CCR3+ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in patients with acute visceral leishmaniasis. Immunology, v. 113, p. 260-268. 2004.
- POWER, C.A., WEI, G., BRETSCHER, P.A. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. Infection and Immunity, v. 66, p. 5743-5750. 1998.
- POZIO, E., GRADONI, L., BETTINI, S., GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): 4. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). Acta Trop., v. 38, p. 383. 1981.
- QUINNELL, R.J., COURTTENAY, O., DAVIDSON, S., GARCEZ, L., RAMOS, P., SHAW, J.J., SHAW, M.A., DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort of Brazilian dogs. Parasitology, v. 122, p. 253-261. 2001.

- QUINNELL, R.J., COURTENAY, O., GARCEZ, L.M., KAYE, P.M., SHAW, M.A., DYE, C., DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 91, p. 161-168. 2003.
- RAMIRO, M.J., ZARATE, J.J., HANKE, T., RODRIGUEZ, D., RODRIGUEZ, J.R., ESTEBAN, M., LUCIENTES, J., CASTILLO, J.A., LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. Vaccine, v. 21, p. 2474-2484. 2003.
- REINER, S.L., LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. Annu. Rev. Immunol., v. 13, p. 151-177. 1995.
- REIS, A.B., CARNEIRO, C.M., CARVALHO, M.G., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R.C., MAYRINK, W., GENARO, O., CORREA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O.A. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 103, p. 173-185. 2005.
- RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JAFFE, C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. Veterinary Immunology and Immunopathology. v. 71, p. 69-76. 1999.
- RIBEIRO-GOMES FL, OTERO AC, GOMES NA, MONIZ-DE-SOUZA MC, CYSNE-FINKELSTEIN L, ARNHOLDT AC, CALICH VL, COUTINHO SG, LOPES MF, DOSREIS GA. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. J. Immunol., v. 172, p. 4454-4462. 2004.
- ROBINS, D.B., KATZ, R.L., SWAN, F. JR, ATKINSON, E.N., ORDONEZ, N.G., HUH, Y.O. Immunotyping of lymphoma by fine-needle aspiration. A comparative study of cytopspin preparations and flow cytometry. Am. J. Clin. Pathol., v. 101, p. 569-576. 1994.
- ROGERS, P.R., CROFT, M. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. Immunology, v. 163, p. 1205-1213. 1999.
- SAKAI, M., OTANI, I., WATARI, T., SATO, T., KANAYAMA, K., TAKEUCHI, A., HASEGAWA, A. Phenotypic analysis of hepatic lymphocytes from healthy dogs. J. Vet. Med. Sci., v. 65, p.157-159. 2003.
- SANCHEZ, M.A., DIAZ, N.L., ZERPA, O., NEGRON, E., CONVIT, J., TAPIA, F.J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 70, p. 618-624. 2004.
- SANTOS, W.R., AGUIAR, I.A., PARAGUAI DE SOUZA, E., DE LIMA, V.M., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. Vaccine, v. 21, p. 4668-4676. 2003.
- SATO, N., AHUJA, S.K., QUINONES, M., KOSTECKI, V., REDDICK, R.L., MELBY, P.C.; KUZIEL, W.A., AHUJA, S.S. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for Langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells: absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, B cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. J. Exp. Med., v. 192, p. 205-218. 2000.

- SCHOPF, L.R., BLISS, J.L., LAVIGNE, L.M., CHUNG, C.L., WOLF, S.F., SYPEK, J.P. Interleukin-12 is capable of generating an antigen-specific Th1-type response in the presence of an ongoing infection-driven Th2-type response. Infection and Immunity, v. 67, p. 2166-2171. 1999.
- SILVA, V.O., BORJA-CABRERA, G.P., CORREIA-PONTES, N.N., DE-SOUZA, E.P., LUZ, K.G., PALATNIK, M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). Vaccine, v. 19, p. 1082-1092. 2000.
- SLAPPENDEL, R.J. 1988. Canine leishmaniosis: a review based on 95 cases in the Netherlands. Veterinary Quarterly, v. 10, p. 1-16. 1988.
- SLAPPENDEL, R.J., TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. The Veterinary Quarterly, v. 19, p. 10-13. 1997.
- SMELT, S.C., ENGWERDA, C.R., MCCROSSEN, M., KAYE, P.M. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. J. Immunol., v. 158, p. 3813-3821. 1997.
- SMELT, S.C., COTTEREL, S.E.J., ENGWERDA, C.R., KAYE, P.M. B Cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. J. Immunol., v. 164, p. 3681-3688. 2000.
- SNEIGE, N., DEKMEZIAN, R.H., KATZ, R.L., FANNING, T.V., LUKEMAN, J.L., ORDONEZ, N.F., CABANILLAS, F.F. Morphologic and immunocytochemical evaluation of 220 fine needle aspirates of malignant lymphoma and lymphoid hyperplasia. Acta Cytol., v. 34, p. 311-322. 1990.
- SOLANO-GALLEGO, L., LLULL, J., RAMOS, G., RIERA, C., ARBOIX, M., ALBEROLA, J., FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. Vet. Parasitol., v. 90, p. 37-45. 2000.
- STEIN, V.M., CZUB, M., HANSEN, R., LEIBOLD, W., MOORE, P.F., ZURBRIGGEN, A., TIPOLD, A. Characterization of canine microglial cells isolated ex vivo. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 99, p. 73-85. 2004.
- STOCKHAUS, C., SLAPPENDEL, R.J. Haemophagocytic syndrome with disseminated intravascular coagulation in a dog. J. Small. Anim. Pract., v. 39, p. 203-206. 1988.
- STRAUSS-AYALI, D., JAFFE, C.L., BURSHTAIN, O., GONEN, L., BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. J. Infect. Dis., v. 189, p. 1729-1733. 2004.
- SULAHIAN, A., GARIN, Y.J., PRATLONG, F., DEDET, J.P., DEROUIN, F. Experimental pathogenicity of viscerotropic and dermatropic isolates of *Leishmania infantum* from immunocompromised and immunocompetent patients in a murine model. FEMS Immunol. Med. Microbiol., v. 17, p. 131-138. 1997.
- SUTHERLAND, R.M., MCKENZIE, B.S., ZHAN, Y., CORBETT, A.J., FOX-MARSH, A., GEORGIU, H.M., HARRISON, L.C., LEW, A.M. Anti-CD45RB antibody deters xenograft rejection by modulating T cell priming and homing. Int. Immunol. v. 14, p. 953-962. 2002.

- SVENSSON, M., MAROOF, A., ATO, M., KAYE, P.M. Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. Immunity, v. 21, p. 805-816. 2004.
- TAFURI, W.L., TAFURI, W.L., BARBOSA, A.J., MICHALICK, M.S., GENARO, O., FRANCA-SILVA, J.C., MAYRINK, W., NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 38, p. 81-89. 1996.
- TAFURI, W.L., DE-OLIVEIRA, M.R., MELO, M.N., TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Vet. Parasitol., v. 96, p. 203-212. 2001.
- TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? Am J Trop Med Hyg., v. 52:, p. 287-292. 1995.
- TIPOLD, A., MOORE, P., JUNGI, T.W., SAGER, H., VANDEVELDE, M. Lymphocyte subsets and CD45RA positive T-cells in normal canine cerebrospinal fluid. J. Neuroimmunol., v. 82, p. 90-95. 1998.
- TIPOLD, A., MOORE, P., ZURBRIGGEN, A., BURGENER, I., BARBEN, G., VANDEVELDE, M. Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection. Acta Neuropathologica, v. 97, p. 45-56. 1999.
- TRAVI, B.L., TABARES, C.J., CADENA, H., FERRO, C., OSÓRIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 64, p. 119-124. 2001.
- TRYPHONAS, L., ZAWIDZKA, Z., BERNARD, M.A., JANZEN, E.A. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. Can. J. Comp. Med., v. 41, p. 1-12. 1977.
- VALLADARES, J.E.; RIERA, C., ALBEROLA, J., GÁLLEGO, M., PORTÚS, M., CRITÒFOL, C., FRANQUELO, C., ARBOIX, M. Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology, v. 75, p. 33-40. 1998.
- VARGA, S.M., WELSH, R.M. The CD45RB-associated epitope defined by monoclonal antibody CZ-1 is an activation and memory marker for mouse CD4 T cells. Cell. Immunol. v. 167, p. 56-62. 1996.
- WATANABE, T., INOUE, T., OCHI, H., TERASHIMA, M., ASANO, H., NAKATANI, T. Lipid A directly inhibits IL-4 production by murine Th2 cells but does not inhibit IFN- γ production by Th1 cells. Eur. J. Immunol., v. 29, p. 413-418. 1999.
- WEISS, D.J. Flow cytometric evaluation of canine bone marrow based on intracytoplasmic complexity and CD45 expression. Veterinary Clinical Pathology, v. 33, p. 96-101. 2004.
- VEXENAT, J.A., CROFT, S.L., FURTADO-CAMPOS, J.H., MILES, M.A. Failure of buparvaquone (Butalex) in the treatment of canine visceral leishmaniasis. Short Communication. Veterinary Parasitology, v. 77, p. 71-73. 1998.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva. Technical Report Series, n. 793. 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis and Leishmaniasis / HIV coinfection. (WHO / CDC / CSR/ ISR), p. 1-2. 2000.
- WILLIAMS, D.L. Studies of canine leukocyte antigens: a significant advance in canine immunology. The Veterinary Journal, v. 153, p. 31-39. 1997.
- WILSON, M.E., SANDOR, M, BLUM, A.M., YOUNG, B.M., METWALI, A., ELLIOT, D., LYNCH, R.G., WEINSTOCK, J.V. Local suppression of IFN- γ in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. J. Immunol., v. 156, p. 2231-2239. 1996.
- YAMATE, J., YOSHIDA, H., TSUKAMOTO, Y., IDE, M., KUWAMURA, M., OHASHI, F., MIYAMOTO, T., KOTANI, T., SAKUMA, S., TAKEYA, M. Distribution of cells immunopositive for AM-3K, a novel monoclonal antibody recognizing human macrophages, in normal and diseased tissues of dogs, cats, horses, cattle, pigs, and rabbits. Vet. Pathol., v. 37, p. 168-76. 2000.
- YEUNG, V.P., GIENI, R.S., UMETSU, D.T., DEKRUYFF. Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-dominated immune responses into Th1-dominated responses. The Journal of Immunology, v.161, p. 4146-4152. 1998.
- ZANDBERGEN, G., KLINGER, M., MUELLER, A., DANNENBERG, S., GEBERT, A., SOLBACH, W., LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J. Immunol., v. 173, p. 6521-6525. 2004.
- ZANDER, D.S., ITURRASPE, J.A., EVERETT, E.T., MASSEY, J.K., BRAYLAN, R.C. Flow cytometry. In vitro assessment of its potential application for diagnosis and classification of lymphoid processes in cytologic preparations from fine-needle aspirates. Am. J. Clin. Pathol., v. 101, p. 577-586. 1994.
- ZEPPA, P., VETRANI, A., LUCIANO, L., FULCINITI, F., TRONCONE, G., ROTOLI, B., PALOMBINI, L. Fine needle aspiration biopsy of the spleen. A useful procedure in the diagnosis of splenomegaly. Acta Cytol., v. 38, p. 299-309. 1994.
- ZEPPA, P., PICARDI, M., MARINO, G., TRONCONE, G., FULCINITI, F., VETRANI, A., ROTOLI, B., PALOMBINI, L. Fine-needle aspiration biopsy and flow cytometry immunophenotyping of lymphoid and myeloproliferative disorders of the spleen. Cancer, v. 99, p. 118-127. 2003.
- ZIJLSTRA, E.E., EL-HASSAN, A.M. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 95, S27-S58. 2001.
- ZUCKERMANN, F.A., PEAVEY, C., SCHNITZLEIN, W.M., SCHABACKER, D., HUSMANN, R.J., YANG, H., SAALMULLER, A., LUNNEY, J.K. Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 60, 367-387. 1998.
- ZUCKERMANN, F.A., SCHNITZLEIN, W.M., THACKER, E., SINKORA, J., HAVERSON, K. Characterization of monoclonal antibodies assigned to the CD45 subgroup of the Third International Swine CD Workshop. Vet. Immunol. Immunopathol., v. 80, p. 165-174. 2001.

11. APÊNDICES

Apêndice 1.

Purificação de leucócitos esplênicos e do sangue periférico.

Protocolo de purificação de leucócitos:

- Adicionar 2 mL de sangue ou todo o volume de aspirado esplênico a 10 mL de RPMI contendo 50 UI de heparina / mL, em tubo de polietileno com tampa e conservar em gelo;
- No laboratório, completar o volume para 40 mL com RPMI e centrifugar a 1800 rpm, a 4° C, por 20';
- Desprezar o sobrenadante cuidadosamente e ressuspender o sedimento com solução de lise de hemácias, até atingir 50 mL;
- Homogeneizar o conteúdo suavemente, por inversão manual, até o líquido ficar translúcido (média 8 -10 minutos), à temperatura ambiente;
- Centrifugar a 1800 rpm, a 4° C, por 10';
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento com HBSS, até atingir o volume de 40ml, homogeneizando suavemente;
- Centrifugar a 1800 rpm, a 4° C, por 20';
- Desprezar o sobrenadante ;
- Ressuspender o sedimento com 1mL de HBSS;
- Contar os leucócitos viáveis em uma alíquota diluída com Azul de Tripán, em Câmara de Neubauer;
- Ajustar as células para 1×10^7 /mL com HBSS;

Preparo da solução de lise de hemácias:

- cloreto de amônio _____ 7 g
- bicarbonato de amônio _____ 70 mg
- água destilada _____ q.s.p. 1000 mL
- Dissolver bem os componentes e conservar a solução em frasco âmbar

APÊNDICE 2.

Citocentrifugação de leucócitos em lâmina

- Trabalhar com a suspensão de células ajustada para 1×10^7 /mL com HBSS;
- Acrescentar igual volume de Shandon (Thermoshandon Collection Fluid) no momento de proceder à citocentrifugação, chegando a uma concentração final de 5×10^6 células /mL;
- Montar as lâminas no suporte da citocentrífuga, com o filtro e o recipiente da suspensão celular com Shandon;
- Homogeneizar cuidadosamente a suspensão de células com a pipeta e aplicar 100 μ L da suspensão no interior do recipiente;
- Centrifugar a 500 rpm por 10';
- Inverter o lado e repetir o processo, para formar 2 spots;
- Separar uma lâmina e corar em HE;
- Fixar as demais lâminas por imersão em álcool a 70% por 3' e em seguida em álcool absoluto por 3';
- Deixar secar à TA, acondicionar em caixas de papelão cobertas com filme de PVC e manter a -70°C até a realização dos ensaios de citoquímica e imunocitoquímica.

APÊNDICE 3.

Coloração pelos corantes de Wright e hematoxilina-eosina:

Hematoxilina / Eosina:

- Mergulhar as lâminas contendo os preparações citocentrifugadas em álcool etílico absoluto por 1’;
- Mergulhar em água;
- Mergulhar em hematoxilina por 1’;
- Mergulhar em água;
- Mergulhar em eosina por 1’;
- Mergulhar em água acética (500ml de água + 5ml de ac. acético glacial);
- Mergulhar em álcool etílico por 1’;
- Mergulhar em xilol por 1’;
- Mergulhar em xilol por mais 1’;
- Montar as lâminas com lamínulas em bálsamo, removendo as bolhas de ar.

Coloração segundo Wright:

- Com o auxílio de uma pipeta acoplada a uma pêra derramar sobre as lâminas quantidade de corante de Wright suficiente p/ cobrir o esfregaço, por 2 ‘;
- Mergulhar as lâminas em água destilada por 10’ para diluir o corante;
- Finalizar a operação lavando cuidadosamente as lâminas em um filete de água;
- Limpar o fundo de cada lâmina com algodão embebido em álcool e dispô-las na posição vertical, em galeria apropriada p/ lâminas;
- Secar à temperatura ambiente;

Preparo do corante de Wright:

- eosina azul de metileno _____ 3,0 g
- metanol P.A. _____ q.s.p. 1000 mL
- Homogeinizar manualmente
- Deixar em repouso por no mínimo 10 dias antes de usar.

APÊNDICE 4.

Imunofluorescência com AcMo em preparações citocentrifugadas

- Mergulhar as lâminas em salina tamponada com fosfato a 0,15 M, pH 7.4 (PBS) por 1 minuto;
- Bloquear sítios de ligação inespecífica com 40 μ L de IgG de coelho a 10 μ g/mL em PBS contendo 5% de leite desnatado (ou soro de coelho a 10%);
- Incubar por 20' em câmara úmida, à temperatura ambiente (TA);
- Lavar 3 vezes por imersão em PBS;

- Adicionar os anticorpos monoclonais (AcMo) específicos para leucócitos de cão e controles negativos, em concentração determinada por titulação prévia, em volumes de 40 μ L, diluídos em PBS contendo 0,05% de Tween-20 e 5% de leite desnatado (PBS-T-leite):
 - Feitos em rato: anti-CD45RA (YKIX 753) e anti-CD45RB (YKIX 716)
 - Feitos em camundongo: marcador de CD45 (AB6) e de fagócitos (IH1)
 - Controles negativos: Diluente
 - Soro de camundongo na diluição 1:500
 - Soro de rato na diluição 1:500
- Incubar por 1 hora em câmara úmida, à TA;
- Lavar 3 vezes por imersão em PBS;

- Adicionar o anticorpo secundário biotilado, diluído em PBS-T-leite, em concentração determinada previamente por titulação, em volumes de 40 μ L, em tubo protegido da luz:
 - Anti-IgG de rato biotilado feito em coelho (1:200)
 - Anti-IgG de mouse biotilado feito em coelho, (1:100)
- Incubar por 1 hora em câmara úmida, à TA;
- Lavar 3 vezes por imersão em PBS;

- Aplicar streptavidina conjugada com fluoresceína, em diluição determinada previamente por titulação (1:500) em PBS-T-leite, em volumes de 40 μ L, em tubos protegidos da luz:
- Incubar por 45' em câmara úmida, à TA, no escuro;
- Lavar 3 vezes por imersão em PBS-T e 3 vezes em água destilada;
- Aplicar volumes de 40 μ L de iodeto de propídeo (1:200 em PBS)
- Lavar imediatamente 3 vezes por imersão em PBS-T e 3 vezes em água destilada;
- Montar das lâminas com bálsamo "anti-fading", retirando o excesso do bálsamo e as bolhas de ar;
- Guardar em caixas fechadas, ao abrigo da luz e realizar a leitura em microscópio de fluorescência e fotografar.

APÊNDICE 5.

Imunoperoxidase com AcMo em preparações citocentrifugadas

- Mergulhar as lâminas em salina tamponada com fosfato a 0,15 M, pH 7.4 (PBS) por 1 minuto, à TA;

- Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com 40µL da solução:

PBS _____	1425 µL
azida sódica a 10% em água _____	25 µL
peróxido de hidrogênio 30% _____	50 µL

- Incubar por 30' em câmara úmida, à TA;

- Lavar 3 vezes por imersão em PBS-T;

- Proceder ao bloqueio de sítios de ligação inespecífica com 40µL de IgG de coelho a 10 µg/mL em PBS contendo 1% de soro bovino fetal (SBF), ou soro de coelho a 10% em PBS-SBF;

- Incubar por 30' em câmara úmida, à TA;

- Lavar 3 vezes por imersão em PBS;

- Adicionar os anticorpos monoclonais (AcMo) específicos para leucócitos de cão e controles negativos, em concentração determinada por titulação prévia, em volumes de 40µL, diluídos em PBS-T contendo 1% de SBF (PBS-SBF)

Feitos em rato: anti-CD45RA (YKIX 753) – 1: 10

anti-CD45RB (YKIX 716) – 1: 50

Feitos em camundongo: marcador de CD45 (AB6) – 1:500

marcador de fagócitos (IH1) – 1:40

Controles negativos: Diluente

Soro de camundongo na diluição 1:500

Soro de rato na diluição 1:500

- Incubar por 1 hora em câmara úmida, à TA;

- Lavar 3 vezes por imersão em PBS-T;

- Adicionar os anticorpos secundários biotinilados, diluído em PBS-T-SBF, contendo 1% de soro de cão saudável, em concentrações determinadas previamente por titulação, em volumes de 40 μ L, em tubo protegido da luz:

Anti-IgG de rato biotinilado, feito em coelho (1:200)

Anti-IgG de mouse biotinilado, feito em coelho (1:100)

- Incubar por 1 hora em câmara úmida, à TA;

- Lavar 3 vezes por imersão em PBS-T;

- Aplicar de streptavidina conjugada com peroxidase, em diluição determinada previamente por titulação (1:500) em PBS-SFB, em volumes de 40 μ L, em tubos protegidos da luz:

- Incubar por 45' em câmara úmida, à TA, no escuro;

- Lavar 3 vezes por imersão em PBS-T

- Aplicar a solução com o substrato de enzima e o revelador em volumes de 40 μ L:

DAB a 25mg/ml _____ 24 μ L

PBS _____ 966 μ L

Peróxido de hidrogênio 30% _____ 1 μ L

- Incubar por 2' em câmara úmida, à TA, no escuro;

- Lavar 3 vezes por imersão em água destilada;

- Proceder à contra-coloração com hematoxilina filtrada por 15";

- Lavar 3 vezes por imersão em água destilada;

- Mergulhar em álcool etílico a 70% por 3';

- Mergulhar em álcool etílico absoluto por 3';

- Mergulhar em xilol;

- Montar as lâminas com bálsamo;

- Contar as células marcadas sob microscopia óptica: determinar quantas células são marcadas com DAB em um mínimo de 500 células contadas em cada spot. Contar em duplicata.