

HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS EN PIEL DE CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS CON *Leishmania infantum*, MUNICIPIO BOLÍVAR, ESTADO ARAGUA

Histopathological Findings in Natural Infected Dogs with Leishmania Infantum, Bolivar Country, Aragua State

Andreina R. Rivas Melendez*, Horacio A. Ávila Ulloa**, Levis Sosa***, Carmen J. Silva Sanchez****, Daniela Medina****, Liz A Rodriguez****, Nieves Molina****
y José A. Romero Palmera****

*Departamento de Ciencias Morfofisiológicas, Escuela de Bioanálisis Universidad de Carabobo **Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Bioanálisis Universidad de Carabobo ***Departamento Clínico Integral, Escuela de Bioanálisis Universidad de Carabobo ****Laboratorio de Biología de Vectores y Reservorios, Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y de Salud Ambiental, Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldón” *****Maestría de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

Correo-E:jromero114@gmail.com

Recibido: 22/03/17 - Aprobado: 09/11/17

RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad metaxénica, de distribución mundial, producida por diversas especies de protozoarios del género *Leishmania*, transmitida por vectores del género *Lutzomyia*. Clasificada en cutánea, muco cutánea y visceral, *Leishmania infantum* es la especie causante del patrón visceral y el canino (*Canis familiaris*) es su principal reservorio. El tropismo de *L. infantum* induce la sintomatología y el daño tisular en la leishmaniasis visceral canina (LVC), la cual cursa con la triada sintomatológica (fiebre alta, hepatoesplenomegalia y leucopenia, seguida de pancitopenia), provoca daños locales en el sitio de inoculación, por la interacción parásito-macrófagos regionales y manifestaciones dermatológicas inespecíficas, clínicamente ubicadas dentro de los patrones: asintomáticos, oligosintomáticos y polisintomáticos de la enfermedad. De 14 caninos seropositivos a *L. infantum* (usando el antígeno rK39), procedentes del municipio Bolívar del estado Aragua, localidades Topo I, Topo II y Las Cumbres de Zamora, a 7 animales se les tomaron 3 muestras de piel de 10 puntos

ABSTRACT

Leishmaniasis is a metaxenic disease, worldwide distributed. This disease is produced by several species of protozoa of the genus *Leishmania* and is transmitted by vectors (sandflies) of the genus *Lutzomyia*. *Leishmaniasis* has been classified in cutaneous, muco-cutaneous, and visceral. *Leishmania infantum* is the species responsible for the visceral pattern and the canine (*Canis familiaris*) is the main reservoir. The tropism of *L. infantum* induces the symptomatology and the tissue damage in canine visceral leishmaniasis, which is characterized by the symptomatic triad of high fever, hepato-splenomegaly and leucopenia, followed by pancitopenia. This disease causes local damage at the site of inoculation due to the interaction between the parasite and the regional macrophages and to nonspecific dermatological manifestations, clinically located within the asymptomatic, oligosymptomatic, and polysymptomatic patterns of the disease. In this investigation, a total of 14 canines from Topo I, Topo II, and Las Cumbres de Zamora, from the Bolívar municipality of the State of Aragua, Venezuela, showed seropositivity to *L.*

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

anatómicos para el estudio histopatológico. Los cortes histológicos para el estudio microscópico, se obtuvieron mediante el empleo de técnicas histológicas de rutina, con la coloración de Hematoxilina-Eosina. Como consecuencia de la infección, se generaron anticuerpos. Clínicamente los animales mostraron patrones asintomáticos u oligosintomáticos, con lesiones inespecíficas en diversas regiones anatómicas. No se evidenciaron cambios celulares; sin embargo, en epidermis se apreciaron zonas con hiperqueratosis, acantosis, e infiltrado neutrofílico en glándulas sudoríparas y sebáceas; en dermis se observó, infiltrado inflamatorio linfohistioplasmocitario y edema intersticial o interfibrilar, en hipodermis se observó neovascularización e inflamación linfoplasmocitaria periductal. No se evidenciaron amastigotes en células fagocíticas.

infantum (using the rK39 antigen). To perform the histopathological study, 7 of them were taken 3 skin samples of 10 anatomical points. The histological sections for the microscopic study were obtained using the hematoxylin-eosin technique. As a result of the infection, antibodies were generated. From the clinical standpoint, the animals showed asymptomatic or oligosymptomatic patterns, with nonspecific lesions in diverse anatomical regions. No cellular changes were evident; however, in the epidermis, areas with hyperkeratosis, acanthosis, and neutrophilic infiltrate were observed in sweat and sebaceous glands; in the dermis, a lymphohistioplasmocytic inflammatory infiltrate and interstitial or interfibrillar edema was detected; in the hypodermis, neovascularization and periductal lymphoplasmatic inflammation was noted. No amastigotes were evident in phagocytic cells.

(Palabras clave: Leishmaniasis visceral canina; piel; histopatología)

(Key words: Canine Leishmaniasis visceral, skin, histopathology)

INTRODUCCIÓN

Leishmania infantum, es un protozooario tripanosomatídeo del género *Leishmania* responsable de la leishmaniasis visceral, en las Américas y otras latitudes, cuyo reservorio principal es el perro doméstico (*Canis familiaris*). El mecanismo de transmisión es a través de la picadura de la hembra de un díptero hematófago perteneciente al género *Lutzomyia* [1, 2, 3]. Al inocularse la forma flagelada de promastigote en la piel del canino, ésta se aloja en las células de Langerhans locales, en donde pierde el flagelo transformándose en amastigote, iniciándose una respuesta inflamatoria local transitoria denominada chancro de inoculación, en lo sucesivo podrían aparecer o no lesiones dermatológicas o extradermatológicas, lo que conlleva a que el curso clínico de la enfermedad siga patrones asintomáticos, oligosintomáticos o polisintomáticos. Las lesiones dermatológicas en la LVC son inespecíficas y podrían ser similares a las de otras patologías.

La afección puede iniciarse con una lesión cutánea, localizada o múltiple, el chancro de inoculación, que suele presentarse a nivel de la cabeza (morro, hocico, borde externo y cara interna de las orejas) [4]. La

presencia y diseminación del parásito a nivel cutáneo puede manifestarse con la aparición de lesiones generalizadas, simétricas y no pruriginosas que se caracterizan por la presentación de descamaciones epidérmicas y alopecia difusa, especialmente a nivel de la cabeza. Son clásicas la despigmentación y depilación periorbital (signo de las gafas) que pueden afectar también a otras regiones del cuerpo (borde de las orejas, región glútea, cola, punto de apoyo a nivel de las patas). Son frecuentes otros signos cutáneos como la hiperqueratosis y la presencia de caspa, particularmente evidente cuando se acaricia al perro a contrapelo, recrecimiento ungueal (onicogrifosis). También pueden aparecer lesiones ulcerativas a nivel del cráneo, del borde de las orejas, de los puntos de apoyo, de los cojinetes plantares y del morro, de los espacios interdigitales y zonas mucocutáneas, lesiones nodulares o dermatitis pustular [5]. Finalmente, el parásito produce disfunción y destrucción de las células mononucleares, en este caso, el perro pasa a ser un reservorio que puede contagiar a otro hospedador sano de su misma especie o al hombre a través de la picadura del vector, repitiendo el ciclo [6]. Internamente, la multiplicación de las leishmanias puede producir cambios inflamatorios a nivel de

los ganglios linfáticos, hígado, médula ósea, bazo, y en epitelios del tracto digestivo y respiratorio a nivel de la cavidad nasal principalmente [7]. Por lo anteriormente expuesto y considerando que la piel, es uno de los principales órganos donde se manifiesta la enfermedad, es pertinente conocer histológicamente los daños celulares y tisulares en los estratos de la piel de caninos naturalmente infectados con *Leishmania infantum* procedentes de un área endémica de LV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Previo consentimiento informado, se incluyeron 74 caninos censados de las localidades de Topo I, Topo II y Las Cumbres de Zamora ubicadas en San Mateo, municipio Bolívar, estado Aragua, para la evaluación serológica y clínica, en la primera se empleó el ensayo inmunoenzimático ELISA con el antígeno recombinante rK39, se consideró positivo a los valores superiores al punto de corte (0,100) [8] y en la segunda, se consideraron los criterios clínicos establecidos por Oliva *et al.* [9], categorizándolos en asintomáticos, oligosintomáticos y sintomáticos. De 14 caninos naturalmente infectados con *Leishmania infantum*, solo siete se incluyeron en el estudio histopatológico, lo que arrojó una proporción de participación y adherencia de 0,50.

Posteriormente, se realizó el muestreo para el diagnóstico histopatológico y parasitológico [10], previa medicación pre-anestésica con clorhidrato de xilacina para su sedación, seguida de medicación con tiopental sódico al 2%, logrando el plan anestésico hasta el cese de las funciones vitales; posteriormente se ejecutó la necropsia [11].

Muestras de Tejidos

Se extrajeron muestras de 10 puntos anatómicos de piel: de las regiones axilar, hombro, inguinal, muslo, periné, hocico, interdigital, dorsal, ventral y auricular, para el estudio histopatológico, realizándose según la técnica descrita por García [12] que consiste en la extracción de muestras de tejidos de un grosor no mayor de 0,5 cm por 2 cm de ancho, para luego preservarlos en una solución tamponada de formalina al 10%, en relación fragmento de tejido-volumen 1:10 y colocados en recipientes adecuadamente identificados. Para la selección del sitio de muestreo, se consideró el criterio establecido por Ferrer *et al.* [13], el cual evidencia una lesión macroscópica

inespecífica toma la biopsia de tejido en la adyacencia a un borde indurado de una lesión inespecífica de la piel. Por cada región anatómica se tomaron tres puntos, concentrándolo un caso.

Diagnóstico Histopatológico

En el Laboratorio de Histotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, las muestras tisulares correspondientes a animales seropositivos, se procesaron mediante deshidrataciones progresivas con soluciones alcohólicas de concentraciones crecientes (60-70-90 y 100%), se clarificaron con xilol y se impregnaron en parafina hasta enfriar. Después de solidificada la parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 micrones y se procediendo a teñirlas según la técnica histológica de Hematoxilina-Eosina (HE) de Stevens y Lowe [14].

Diagnóstico Parasitológico

Durante el acto instrumental de la necropsia, se realizaron frotis por aposición en portaobjetos 20x20, de bazo, hígado, médula ósea, ganglios linfáticos mesentéricos, axilares y poplíteos; coloreados con Giemsa modificado.

Se observaron los cortes histológicos y frotis por aposición en un microscopio óptico marca Nikon modelo Eclipse E-200, las fotomicrografías fueron tomadas con un reproductor de imágenes digital para microscopio marca Celestron con resolución de 2 megapíxeles.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el programa computarizado Microsoft Office Excel 2003, para la estadística descriptiva con medidas de tendencia central, como lo señala Steel y Torrie [15].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La condición física integral de los siete caninos fue buena, caracterizada por normopeso según el patrón racial del individuo, respuesta a estímulo palpebral, frecuencia respiratoria (20 a 40 movimientos/min), frecuencia cardíaca (70-180 latidos/min) y temperatura (37,5 a 39,5°C), dentro del rango normal (Cuadro 1); sin síntomas ni signos clínicos

sugestivos de otra patología concomitante a LVC. No obstante, la pesquisa serológica de anticuerpos anti-*Leishmania infantum* más la evidencia de amastigotes en bazo y ganglios linfáticos (Figura 1A, 1B), en el 57,14% (4/7) de los individuos, confirman que al inocularse el promastigote, se provoca un parasitismo intenso del sistema fagocítico mononuclear con destrucción celular por la ruptura de nidos de amastigotes generando una reacción inflamatoria intensa, alteración de órganos y su funcionamiento, como lo señalan Abranches *et al.* [16] y Moreno y Alvar [2].

Ahora bien, considerando lo anterior, el diagnóstico clínico del 85,72% de los individuos (6/7) fue asintomático, sin síntomas ni signos sugestivos de la enfermedad y forma clínica latente de LVC; y solo uno (1) oligosintomático, porque presentó una lesión ulcerativa regresiva de 4 mm de diámetro, de resolución espontánea en un lapso de 15 d, y áreas de dermatitis seborreica; lo que se enmarca en la presentación cutánea de curso subagudo, acorde a lo señalado por Ferrer *et al.* [13] y Gradoni *et al.* [17]. Sin embargo, en la totalidad de los individuos evaluados se evidenciaron lesiones dérmicas inespecíficas con frecuencia de ocurrencia cercana al 10% en 8 puntos anatómicos, y para la región ventral y auricular de 6 y 4%, respectivamente, permitiendo inferir que el parásito está disperso uniformemente en la superficie corporal, independientemente de las condiciones *per se* de cada región, como la humedad, cobertura pilosa e inclusive pequeñas diferencias de pH y temperatura, pudiéndose estar vinculado, en parte, a la conducta trófica de los agentes patógenos y a su sobrevivencia en el medio ambiente a diferentes temperaturas, como lo señala Duran *et al.* [18]. En contraposición de Camaaño *et al.* [19], señalan que el desarrollo óptimo de amastigotes de *Leishmania infantum* se da a 33°C, en macrófagos de caninos en condiciones *in vitro*.

Las células del estrato epidérmico se observaron histológicamente conservadas; sin embargo, a nivel tisular se evidenciaron daños en diferentes grados, similares a los reportados por Reyes [5]. Entre ellos, se observó en el 91,85% hiperqueratosis caracterizada por el engrosamiento del estrato corneo, constituido principalmente por queratinocitos muertos (Cuadro 2; Figura 2A). Hipergranulosis o aumento del espesor del estrato granuloso, por hiperplasia (más de 5 capas de queratinocitos compactados) en 51,02% (Figura

2B). Exocitosis en 20,4%, caracterizada por el paso de elementos celulares de la dermis a la epidermis (Figura 2C) y acantosis en 8,16% (Figura 2D), representada por hipertrofia de las células del cuerpo de Malpighi. En concordancia con Gross *et al.* [20] estas lesiones podrían asociarse a las manifestaciones clínicas de la piel características de la LVC. También se evidenció infiltrado inflamatorio polimorfonuclear neutrofílico en glándulas sudoríparas (Figura 3A) y sebáceas (Figura 3B), disminución del número de anagen y catagen con la correspondiente expresión clínica de alopecia, pudiéndose deber a la acción traumática local [21].

En la dermis al igual que en el estrato epidérmico, la morfología de las células que la constituyen se observó conservada sin cambios vasculares ni hemodinámicos; sin embargo, en el espacio intersticial de la dermis superficial, se apreciaron alteraciones tales como infiltrado inflamatorio en 97% (40/49 cortes) de tipo mononuclear (macrófagos, linfocitos y plasmocitos), 3% fue polimorfonuclear (neutrófilos) (Figura 4A), coincidiendo con los reportados por Reyes *et al.* [5], Dos Santos *et al.* [22], Costa *et al.* (2008) y Alves *et al.* [23]. Sin embargo, hay algunos rasgos en los que los resultados obtenidos por los autores antes mencionados discrepan de los encontrados en este estudio, así se tiene que Dos Santos *et al.* [22] encontraron las lesiones antes descritas en perros naturalmente infectados con *L. infantum*, asociándolos con una elevada carga parasitaria ya que evidenciaron la presencia de amastigotes en la piel de aproximadamente 50% de los animales diagnosticados. Igualmente, Verçosa *et al.* [24] asociaron la presencia del infiltrado inflamatorio con variaciones en su constitución celular, de acuerdo a la intensidad de la carga parasitaria y de los síntomas clínicos de la enfermedad, de manera que, en la piel de perros positivos a LV sintomáticos con carga parasitaria baja, el infiltrado fue mononuclear sin neutrófilos visibles mientras que con la misma categoría clínica, pero con una elevada carga parasitaria, el infiltrado celular estuvo constituido por macrófagos, plasmocitos y una gran cantidad de neutrófilos. Este resultado coincide parcialmente con el único caso clínicamente oligosintomático estudiado en la presente investigación; estos hallazgos podrían deberse a la participación de los neutrófilos en las etapas tempranas de la infección por *L. infantum* [25]. Sin embargo, en el mismo estudio realizado

Cuadro 1. Constantes fisiológicas, lesiones dermatológicas y diagnósticos clínico, serológico y parasitológico de la muestra en estudio

N° de canino	Constantes Fisiológicas			Lesiones Dermatológicas			Diagnóstico	
	Frecuencia Cardíaca (Latidos/min)	Frecuencia Respiratoria (Movimientos/min)	Temperatura Corporal (°C)	Región anatómica	Severidad	Clinico	Serológico rK39	Parasitológico
1	84	32	38,2	1, 2, 3, 4, 7, 8	Leve	Asintomático	0,122	+
2	88	36	37,9	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9	Leve	Asintomático	0,238	+
3	76	36	38,8	2, 4, 7, 9, 10	Leve	Asintomático	0,273	+
4	72	28	39,4	2, 3, 5, 8, 9	Leve	Asintomático	0,221	+
5	84	32	39,1	1, 2, 3, 4, 9	Leve	Asintomático	0,109	+
6	72	36	37,9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	Moderado	Asintomático	0,359	+
7	84	40	38,5	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	Moderado	Oligosintomático	0,428	+
χ	80,00	34,30	38,54					

1 Axilar, 2 Hombro, 3 Muslo, 4 Pezón, 5 Dorsal, 6 Auricular, 7 Hocico, 8 Interdigital, 9 Inguinal, 10 Vientre

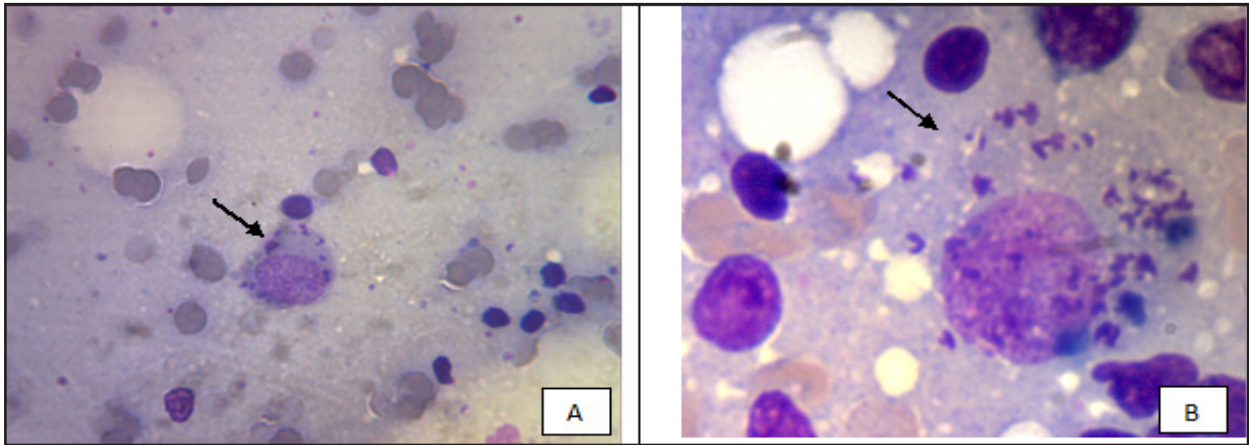


Figura 1. Fotomicrografía de frotis por aposición de ganglio linfático mesentérico 750X A. Ganglio Linfático Poplíteo 1500 X. B. Macrófagos (Flecha) repletos de amastigotes de *Leishmania infantum*. Tinción de Giemsa modificada

Cuadro 2. Frecuencia de hallazgos histopatológicos epidérmicos compatibles con *Leishmania infantum* en caninos por región anatómica

Región anatómica	% de presentación de lesiones macroscópicas	N	Hallazgos histopatológicos epidérmicos									
			Hiperqueratosis		Exocitosis		Hipergranulosis		Acanthisis		Infiltrado Inflamatorio Neutrofilico (Glándulas Sebáceas)	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Axilar	71,43	5	5	100	4	80	5	100	1	20	1	20
Hombro	100,00	7	7	100	-	-	5	71	-	-	-	-
Muslo	85,71	6	6	100	3	25	7	58	1	8	-	-
Periné	85,71	6	6	100	-	-	4	66	-	-	-	-
Dorsal	57,15	4	4	100	-	-	-	-	-	-	-	-
Auricular	28,57	2	2	100	-	-	2	100	-	-	-	-
Hocico	71,43	5	4	80	1	20	3	60	1	20	-	-
Interdigital	71,43	5	4	80	1	20	4	80	1	25	-	-
Inguinal	85,71	6	4	67	-	-	3	50	-	-	-	-
Vientre	42,84	3	2	66	2	66	2	66	2	66	-	-
TOTAL	70,00	49	44	89,8	11	22,4	35	71,4	6	12,2	1	20

por Verçosa *et al.* [24], también se estudiaron perros con LVC clínicamente asintomáticos, en el que fueron reportados: infiltrados locales y multifocales localizados en las zonas foliculares y perivasculares, constituidos por linfocitos y plasmocitos, presencia de granulomas y ausencia de amastigotes, estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en el presente estudio.

En cuanto a la presencia de edema de colágeno en el espacio intersticial de la dermis se observó en 10,20% (5/49 cortes; Figura 4B) de los casos, los resultados de esta investigación discrepan parcialmente

de lo reportado por Alves *et al.* [23], ya que estos autores asociaron la elevada carga parasitaria, con la patogénesis de la reacción inflamatoria y la magnitud del daño tisular reflejado en el estudio, y que esto podría explicar la intensidad del daño a los componentes de la matriz extracelular causado por la cantidad de amastigotes en la piel de los animales enfermos; sin embargo, aún cuando en esta investigación se presentaron zonas con edemas de colágeno, éstos no podrían ser atribuidos a la carga parasitaria, sino más bien a la reacción inflamatoria sin precisar su causa, ya que los caninos en su mayoría fueron clínicamente

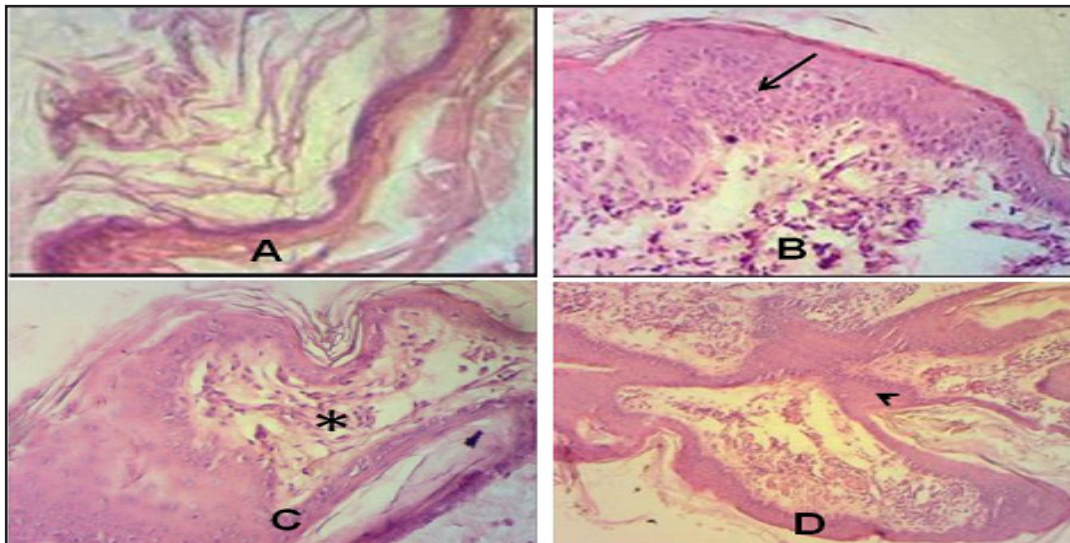


Figura 2. Fotomicrografía de piel de canino naturalmente infectado con *Leishmania infantum*: A. Región auricular con hiperqueratosis (600X). B. Hipergranulosis en la región interdital (flecha) (150X). C. Exocitosis (asterisco) (150X). D. Acanthisis, (punta de flecha) (150X). H-E

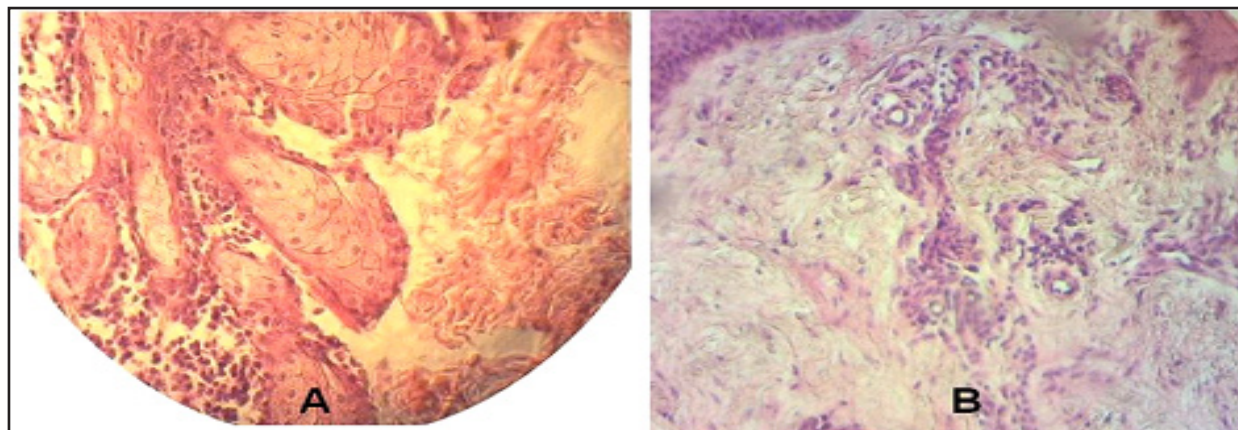


Figura 3. Fotomicrografía de piel de canino naturalmente infectado con *Leishmania infantum*: A. Dermatitis seborreica (400X). B. Inflamación de glándulas sudoríparas (60X) H-E

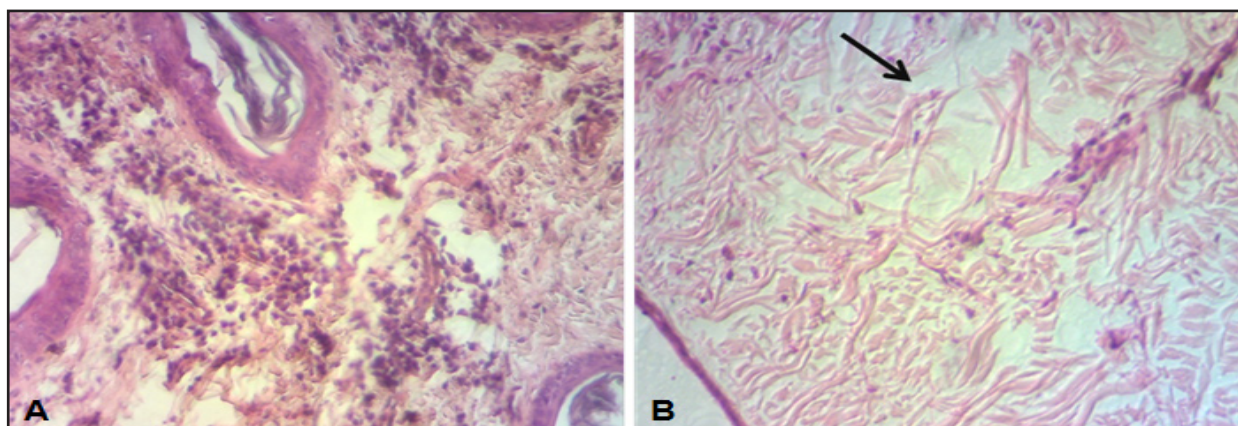


Figura 4. Fotomicrografía de piel de canino naturalmente infectado con *Leishmania infantum*, A. Infiltrado inflamatorio mononuclear región del periné H-E (150X). B. Edemas de colágeno (flecha) región del hocico. H-E (60X)

Cuadro 3. Frecuencia de hallazgos histopatológicos dérmicos, por región anatómica, compatibles con *Leishmania infantum* en caninos

Región anatómica	% de presentación de lesiones macroscópicas	N	Hallazgos histopatológicos dérmicos					
			Inf. Inflamatorio		Edema		Nódulos	
			n	%	n	%	n	%
Axilar	71,43	5	4	80	1	20	-	-
Hombro	100,00	7	4	57	-	-	-	-
Muslo	85,71	6	4	67	-	-	-	-
Periné	85,71	6	10	83	1	8	-	-
Dorsal	57,15	4	5	83	-	-	-	-
Auricular	28,57	2	4	80	2	40	-	-
Hocico	71,43	5	5	100	-	-	1	25
Interdigital	71,43	5	3	75	-	-	-	-
Inguinal	85,71	6	2	66	2	66	-	-
Ventre	42,84	3	2	100	-	-	-	-
TOTAL	70,00	49	43	87,8	6	12,2	1	2

asintomáticos pero no se observaron amastigotes en ninguno de los cortes de piel estudiados, pudiéndose deber a la técnica de coloración empleada (H-E) y/o carga parasitaria. De allí que, los métodos de marcaje *in situ* e inmunohistoquímicos podrían garantizar la pesquisa de amastigotes en células linforeticulares y en otros tipos de celulares [27, 28].

En la hipodermis, la morfología de las células y componentes tisulares se evidenció conservada, en un solo un corte (2,04%) se apreció inflamación linfoplasmocitaria periductal con vacuolización citoplasmática epitelial (Figura 5).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En la infección natural con *Leishmania infantum* en caninos procedentes de las áreas endémicas del municipio Bolívar, estado Aragua, se generaron anticuerpos contra el protozoario, y clínicamente se presentó en patrones asintomáticos u oligosintomáticos, con lesiones inespecíficas en diversas regiones anatómicas. No se evidenciaron cambios celulares en la piel, sin embargo, microscópicamente en epidermis se apreciaron zonas con hiperqueratosis, hipergranulosis, acantosis, e infiltrado de neutrófilos en glándulas sudoríparas y sebáceas; en dermis infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario intersticial, edema de colágeno y presencia de estructuras nodulares y en hipodermis, se observó inflamación linfoplasmocitaria periductal, neovascularización.

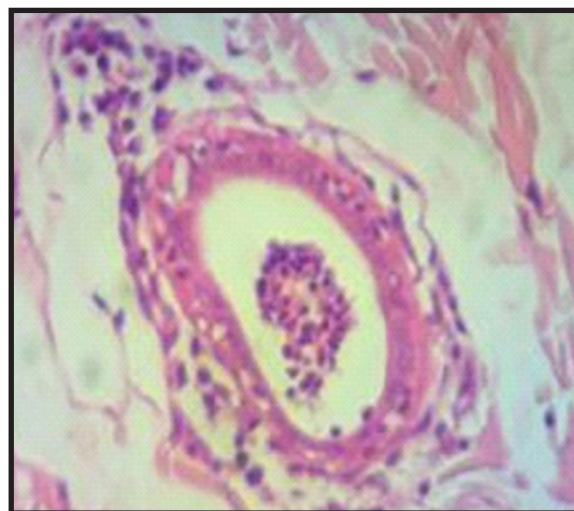


Figura 5. Fotomicrografía de piel de canino naturalmente infectado con *Leishmania infantum*, inflamación linfoplasmocitaria periductal con vacuolización citoplasmática epitelial, dermis profunda región del muslo. H-E (150X)

No se evidenciaron amastigotes en células fagocíticas. Se recomienda ampliar el estudio con técnicas de coloración diferencial como el Azul de Tripán o métodos inmunohistoquímicos.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores manifestamos que no hubo conflicto de intereses en el desarrollo de esta investigación.

APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

Muestreo: AR, LS, DM y LS. Diagnóstico Inmunológico: NM, CS y DM. Diagnóstico Histopatológico: LS. AR, HA y JR. Análisis e Interpretación de Resultados: AR, HA, CS, LS y JR. Manuscrito: AR, HA, CS, LR y JR.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestra gratitud al personal técnico del LBVR-CEEESA-IAE por su participación en el muestreo, al Sr. Francisco García del Laboratorio de Histotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias UCV por el procesamiento de tejidos y por último al IAE “Dr. Arnoldo Gabaldon” por el apoyo logístico.

REFERENCIAS

1. Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(5):510-517.
2. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002; 18 (9):399-405.
3. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech, MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol.* 1997; 11 (2):105-111.
4. Vidor E, Dereure J, Pralong F, Dubreuil N, Bissuel G, Moreau, Rioux JA. Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. Étude d'une cohorte en région cévenole. *Pratique Medic et Chirurg Anim Compag.* 1991; (26):133-137.
5. Reyes F. Histopatología de la leishmaniasis. *Dermatología venezolana.* 1993; (31 supl.2):22-23.
6. De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmania infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; (98):861-870.
7. Amusatguyman I, Sainz A, Rodríguez F, Tesouro MA. Distribution and relationship between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol.* 2003; 18-(2):147-156.
8. Zerpa O, Ulrich M, Borges R, Rodríguez V, Centeno M, Negrón E. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Rev Panam Salud Publica.* 2003; 13(4):239-245.
9. Oliva G, Foglia V, Pagano A. Evoluzione dei protocolli terapeutici in corso di *Leishmaniosi canina*. *Parassitologia.* 2004; 46(1-2):231-234.
10. Beaver BV, Reed W, Leary S, McKiernan B, Bain F, Schultz R, et al. 2000. Report of the AVMA panel on eutanasia. *J Am Vet Me.* 2001; 218 (5):669-696.
11. Moreno O, Flores G, Sandoval M. Manual de técnicas de necropsia patología general. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. 2006; 77-88.
12. García del MR. Manual de Laboratorio de Anatomía Patológica. McGraw-Hill/Interamericana España. 1993.
13. Ferrer L, Juanola B, Ramos J, Ramis A. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Path.* 1991; (28):342-343.
14. Stevens A, Lowe J. *Histología Humana.* 2^{da} ed. Edit. España: Harcourt Brace. 1998.1-8 p.
15. Steel RG, Torrie IH. *Bioestadística Principios y procedimientos.* 2^{da} ed. Mc Graw-Hill. 1989. 622 p.
16. Abranches P, Silva M, Pereira C, Conceição F, Silva M, Santos G, et al. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol.* 1991; 77 (84):557-561.
17. Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Mancianti F. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol.* 1987; Oct 1 (4):339-342.
18. Duran C, Quiroga M, Díaz-Bello Z, Silva S, Roschman-González A, Srauss M, Tejero F. *Leishmania chagasi* y *Tripanosoma cruzi*: Conducta trófica en cultivos axénicos puros y mixtos. *Bol Mal Salud Amb.* 2009; 49(1): 97-106
19. Caamaño M, Carrasquel E, Gutiérrez C, Agrela I. Establecimiento de un sistema in vitro para el cultivo de *Leishmania chagasi/infantum* en macrófagos de perro. *Salus Online.* 2008; (1) 68-77.
20. Lee Gross T, Ihrke P, Walder E, Affolter V. *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis.* 2^{da} ed. Blackwell Publishing. 2005; 312-316.
21. Camacho F, Montagna W. *Tricología. Enfermedades del folículo pilosebáceo.* Aula Médica. Madrid. 1996.
22. Dos-Santos W, David J, Badaró R, de-Freitas L. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2004; 92(2):89-94.
23. Alves G, Phino F, Silva S, Cruz M, Costa F. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Braz J Med Biol Res.* 2010; Mar 43(3):10-315.
24. Verçosa B, Lemos C, Mendonça I, Silva S, de Carvalho

- S, Goto H, Costa F. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res.* 2008; 4 (45):1-7.
25. Rangel JL, Gadiolli F, Silva M, de Freitas R, Mariotini C, Costa, G, *et al.* The leishmania-macrophage interactions: role of E-NTPDases and purinergic signaling. *Macrophage*, 2016; 3: e1143. doi: 10.14800/Macrophage.1143.
26. Costa M, Lima W, Figueiredo M, Michalick M, Tafuri. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: A histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Vet Pathol.* 2008; 45 (5):613-616.
27. Burna A, Catuogno M, Mirad A, Maccio O. Diagnóstico inmunohistoquímico de un caso de leishmaniasis visceral canina. *Rev Vet.* 2012; 23:144-146.
28. Nieto C, Viñuelas J, Blanco A, García-Alonso M, Verdugo S, Navarrete I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. *Vet Rec* 1996; 139(14):346-7.