

Análise histomorfométrica da matriz extracelular do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*¹

Kris Régia J. Kondo^{2*}, Cláudio César Fonseca², Sérgio Luis P. da Matta³ e Marlene Isabel V. Vilorio²

ABSTRACT.- Kondo K.R.J., Fonseca C.C., Da Matta S.L.P. & Vilorio M.I.V. 2009. [Histomorphometric analysis of the extracellular matrix of popliteal lymph nodes from dogs naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi*.] Análise histomorfométrica da matriz extracelular do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(8):610-616. Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs s/n, Campus Universitário, Viçosa, MG 36570-000, Brazil. E-mail: krisregia@hotmail.com

In the Americas, canine visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi*, an obligatory intracellular parasite of the phagocytic-monocytic system; the main histological changes associated with this disease occur in the lymphoid organs. Although dogs are considered to be the main carriers and disseminators of leishmaniasis in urban areas, there are few studies on the histopathologic and histomorphometric aspects in dogs naturally infected by *L.chagasi* analyzing the interaction between parasite and extracellular matrix. The current study characterize and quantify changes in the cellular and extracellular matrix (collagens type I and III) components of the popliteal lymph node from of 22 dogs with the natural infection by *L. chagasi* confirmed by indirect immunofluorescence assay (IFA) and compare these findings with those found in the popliteal lymph node from 10 non-infected dogs, that reacted negative in the IFA, and were clinically healthy. Lymph node fragments were longitudinally sliced and sections were processed for routine histopathology and stained by hematoxylin and eosin. For histomorphometry, additional sections from the same lymph node were fixed in glycol methacrylate and stained with toluidine blue. Lymph nodes from affected dogs were systemically enlarged, had increased numbers of lymphoid follicles, capsule hyperplasia and hypertrophy, and significant hyperplasia of lymphoid cells. In the lymph nodes from infected dogs, quantitative analyses of collagen fibers revealed predominance of type I collagen over type III fibers. These results demonstrate that dogs infected by *L.chagasi* experience degradation of the extracellular matrix components and consequently destruction of the lymphoid framework, thus altering nodal morphology.

INDEX TERMS: Diseases of dogs, histomorphometry, visceral leishmaniasis, lymph node, extracellular matrix.

RESUMO.- Nas Américas, a leishmaniose visceral canina é causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, um protozoário intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear; as principais alterações histológicas asso-

ciadas a essa doença ocorrem nos em órgãos linfóides. Apesar de o cão ser considerado o principal mantenedor e disseminador da leishmaniose no ambiente urbano, são escassos estudos dos aspectos histopatológicos e histomorfométricos, em cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, que investiguem a interação entre o parasito e a matriz extracelular. Este estudo visou caracterizar e quantificar as alterações dos componentes celulares e da matriz extracelular (colágenos I e III) do linfonodo poplíteo de 22 cães com infecção natural por *L. chagasi* detectada

¹ Recebido em 23 de outubro de 2008.

Aceito para publicação em 21 de fevereiro de 2009.

² Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. Peter Henry Rolfs s/n, Campus Universitário, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. *Autor para correspondência: krisregia@hotmail.com

³ Departamento de Biologia Geral, UFRV, Viçosa, MG.

através da reação de imunofluorescência indireta (RIF) e compará-las com as alterações encontradas no linfonodo poplíteo de 10 cães não-infectados, negativos na RIF e clinicamente saudáveis. Fragmentos dos linfonodos foram seccionados longitudinalmente, processados rotineiramente para exame histológico e corados por hematoxilina-eosina. Cortes adicionais do mesmo linfonodo incluídos em glicol metacrilato foram corados pelo azul de toluidina para histomorfometria. Linfonodos de cães infectados apresentaram linfadenopatia generalizada, aumento do tamanho e do número dos folículos linfóides, hipertrofia da cápsula e hiperplasia linfóide significativa. Nos linfonodos de cães do grupo infectado, a análise quantitativa de fibras colágenas mostrou significativo predomínio do colágeno I sobre o colágeno III. Esses resultados demonstram que cães infectados por *L. chagasi* apresentam degradação dos constituintes da matriz extracelular e conseqüente destruição do arcabouço linfóide, alterando a morfologia do órgão.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de cães, histomorfometria, leishmaniose visceral, linfonodo, matriz extracelular.

INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* transmitidas pela picada de flebotomíneos. Dentre as 15 espécies de *Leishmania* que infectam o homem, 13 têm natureza zoonótica causando as formas visceral, cutânea ou mucocutânea (Gramiccia & Gradoni 2005). Trata-se da sexta endemia tropical em incidência, com prioridades para a Organização Mundial de Saúde. Estima-se que a população mundial exposta ao risco de adquirir a doença seja de 350 milhões de indivíduos e que aproximadamente 12 a 14 milhões de pessoas estejam infectadas (Desjeux 1992, WHO 1990). Nas Américas, a leishmaniose visceral canina (LVC) é causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, um protozoário intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear (MS 2006).

Estudos recentes mostram a ocorrência de alterações da matriz extracelular (MEC) em lesões cutâneas e em linfonodos drenantes causadas por *Leishmania (L.) amazonensis* em diferentes linhagens de camundongos (Abreu-Silva et al. 2004). Resultados anteriores mostraram que enzimas como as metaloproteinases podem modificar a função da matriz extracelular não somente pela degradação de proteínas da matriz, mas também por afetarem fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão (Yamada & Kemler 2002).

Apesar da diversidade de pesquisas sob o mecanismo de patogênese da *L. chagasi*, não há, ainda, muitos estudos referentes às alterações que este parasita possa causar na MEC de órgãos linfóides. Assim, é oportuno investigar a interação entre o parasita e a MEC, a fim de identificar alterações em seus componentes e avaliar as reações celulares desses órgãos. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar e quantificar as alterações na matriz extracelular e

descrever achados histopatológicos dos linfonodos poplíteos de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*.

MATERIAL E MÉTODOS

A estimativa das amostras baseou-se em 5% do número total de cães infectados e registrados pela secretaria epidemiológica da cidade de São Luís, MA, em 2003. Todo experimento foi pautado nas normas da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sendo aprovado pela mesma (Protocolo nº16/2006).

Foram utilizados 22 cães sem raça definida, de ambos os sexos, com sinais clínicos compatíveis com LVC e reativos para *Leishmania chagasi* pela técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIF). Os cães foram obtidos no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Ilha de São Luís, MA, uma área endêmica para leishmaniose. Dez cães saudáveis, obtidos por de triagem clínica e sorológica no Hospital Veterinário da UFV, formaram o Grupo Controle.

De cada cão foram colhidos 6mL de sangue em frasco de vidro sem anticoagulante. A presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro foi avaliada através da RIF para determinar a titulação de cada cão, uma vez que o CCZ adota uma única titulação (1/40) como padrão. Para tal foi utilizado um kit comercial (Biomanguinhos/Fiocruz [Lote 036LC0012; VS/MS 106330001], Avenida Brasil 4365, Manguinhos, RJ). A técnica de ensaio imunoadsorvente enzima-associado (ELISA) foi utilizada para confirmar o RIF. Além de ambas as técnicas sorológicas, realizadas para o diagnóstico da doença, o exame histopatológico revelou a presença de formas amastigotas nos cães sorologicamente positivos, bem como a ausência destas formas no grupo não-infectado. A eutanásia foi realizada por injeção intravenosa de cloreto de potássio e precedida de pré-anestesia com xilazina e anestesia por barbitúrico. A esse procedimento seguiu-se a remoção do linfonodo poplíteo, que era imediatamente fixado em formol a 10% tamponado com fosfato de sódio.

Depois de fixado, o linfonodo poplíteo de cada cão era seccionado longitudinalmente e, os cortes obtidos, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico e incluídos em parafina ou em glicol metacrilato, sendo então seccionados em 4 e 3mm de espessura, respectivamente. Os cortes incluídos em parafina foram corados pela hematoxilina-eosina para análise histopatológica e os cortes incluídos em glicol metacrilato foram corados pelo azul de toluidina para análise histomorfométrica da cápsula, dos seios (subcapsular e medular), dos folículos linfóides e dos cordões medulares. Para cada amostra, a avaliação das fibras colágenas da matriz extracelular foi realizada através do método picosirius polarização (Montes 1996). Para isso, os cortes foram desparafinados, hidratados e corados por uma hora em solução de Sirius Red 0,1%, dissolvida em ácido pícrico aquoso saturado e posteriormente lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris durante três minutos.

A histomorfometria dos componentes conjuntivos e estruturais do linfonodo poplíteo foi realizada com auxílio do programa Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., East-West Hwy 4340, Suite 400, Bethesda, MD, USA). A cápsula foi mensurada traçando-se uma linha desde a face externa do linfonodo até o limite entre cápsula e seio subcapsular (o tecido adiposo infiltrado também foi incluído na mensuração [Fig.1A]). Para mensuração do seio subcapsular, traçou-se uma linha

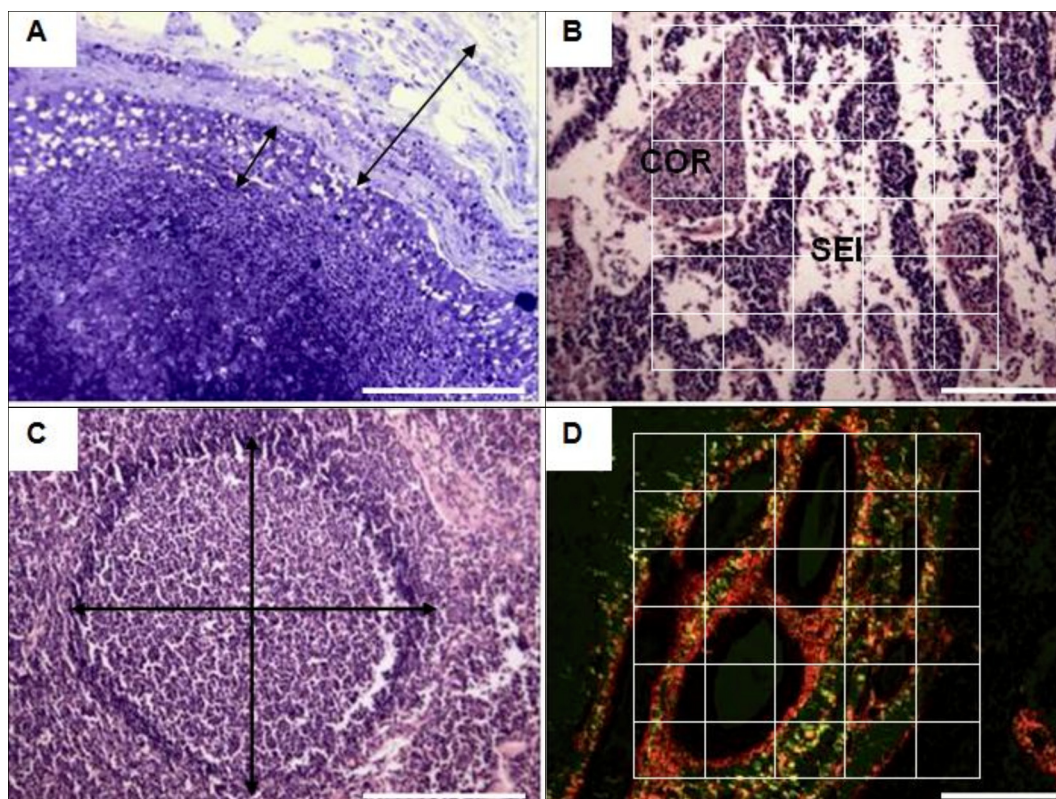


Fig.1. Corte longitudinal do linfonodo poplíteo de cão naturalmente infectado por *Leishmania* (*L.*) *chagasi*. (A) Corte da região cortical mostrando os pontos usados para medir a cápsula (seta maior) e o espaço do seio subcapsular (seta menor). Azul de toluidina, borato de sódio, obj.10x. Barra: 100µm. (B) Modelo de grade usado para registrar as proporções dos componentes da região medular. COR = cordão medular; SEI = seio medular. Hematoxilina-eosina, obj.10x. Barra: 20µm. (C) Imagem do folículo linfóide mostrando metodologia usada para medir o tamanho. Hematoxilina-eosina, obj.10x. Barra: 100µm. (D) Modelo de grade usado para registrar as proporções dos componentes da matriz extracelular. Colágeno do tipo I quantificado como pontos vermelhos, colágeno do tipo III (fibras reticulares) quantificado como pontos verdes. Sirius red sob luz polarizada, obj.4x. Barra:120µm.

entre o limite interno da cápsula e o limite externo da região cortical (Fig.1A). Os constituintes da região medular foram estimados utilizando um retículo com 2.200 intersecções (pontos), através do programa Image Pro-Plus 4.5, contando-se 22.000 pontos por amostra (Fig.1B). Contaram-se todas as intersecções que recaíram sobre os cordões medulares e sobre os seios medulares. Para avaliar a reatividade do folículo linfóide frente à infecção por *L. chagasi*, mensurou-se folículos linfóides que apresentavam centro germinativo (folículo linfóide secundário). O diâmetro nodular médio dos mesmos foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, da média de dois maiores diâmetros principais de cinco secções longitudinais de folículos linfóides por amostra (Fig.1C)

Para análise do colágeno foram selecionados aleatoriamente dez campos e fotografados em microscópio em aumento de 400x com o filtro polarizador acoplado. As fibras colágenas tipo I e tipo III foram estimadas utilizando um retículo com 121 intersecções, através do programa Image Pro-Plus 4.5, contando-se 1.210 pontos por amostra (Fig.1D). Contaram-se todas as intersecções que recaíram sob os pontos birrefringentes amarelos, vermelhos e verdes. Os pontos vermelhos e amarelos foram contados como colágeno do tipo I e os pontos verdes como colágeno do tipo III (Montes 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sorologia obtida dos cães infectados, através da imunofluorescência indireta (RIF), mostrou que a titulação 1:80 foi a mais freqüente entre os cães estudados (Quadro 1). Este título é considerado baixo para LVC, uma vez que há relatos de que cães infectados podem atingir um título de 1:80000 (Cardoso & Cabral 1998). A técnica de ELISA confirmou os resultados positivos obtidos através da RIF. Em todos os cães, do Grupo Controle obteve-se titulação menor que 1:40 (Quadro 1).

Os achados histopatológicos no linfonodo poplíteo dos

Quadro 1. Titulação^a dos 22 cães infectados naturalmente por *Leishmania* (*L.*) *chagasi* e dos 10 cães não-infectados

Grupo	N	Titulação(IgG)
Controle	10	<1:40
Infectado	06	1:40
	12	1:80
	04	1:640

^aObtida por reação de imunofluorescência indireta.

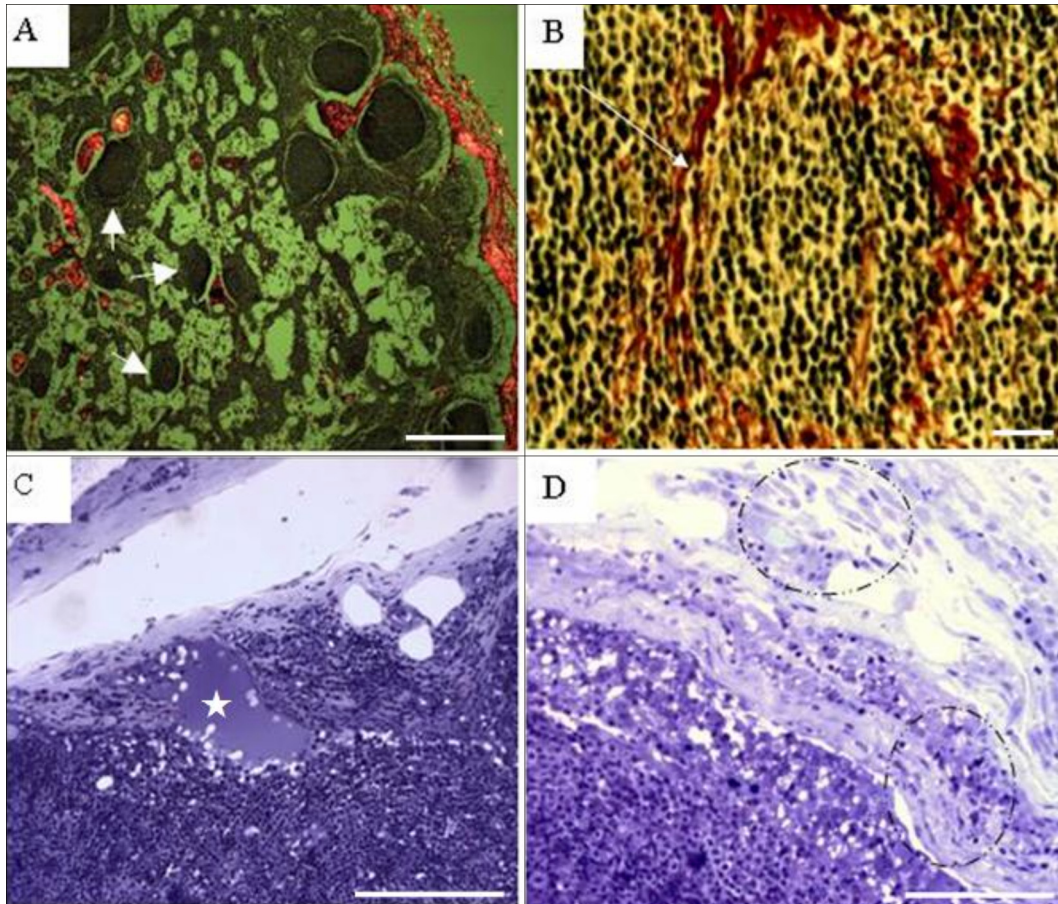


Fig.2. Corte longitudinal do linfonodo poplíteo de cão naturalmente infectado por *Leishmania (L.) chagasi*. (A) Desorganização estrutural do linfonodo evidenciada pela presença de folículos linfóides (setas) no interior da região medular. Picrosirius sob luz polarizada. Obj.4x. Barra: 200µm. (B) Presença de colágeno (seta) ao redor de um folículo linfóide. Picrosirius sob microscopia de luz, obj.40x. Barra: 30µm. (C) Edema («) no seio subcapsular. Azul de toluidina, obj.10x. Barra: 70µm. (D) Infiltrado inflamatório multifocal na cápsula (círculos). Azul de toluidina, obj.10x. Barra: 70µm.

cães naturalmente infectados incluíam linfadenite difusa. As análises mostraram que em 20 (90,9%) das amostras dos linfonodos estudados os cordões medulares estavam distendidos. Em diversas amostras (68,0%) foi possível evidenciar folículos linfóides irregularmente deslocados para as áreas medulares do linfonodo, evidenciando desorganização estrutural nodal (Fig.2A).

Na região cortical foram observados numerosos folículos linfóides secundários com centros germinativos reativos e infiltrado plasmocítico. Em estudo realizado em linfonodos provenientes de diversas regiões do corpo de cães infectados por *L. chagasi* (Lima et al. 2004), foi observada linfadenopatia generalizada com maior proeminência nos linfonodos cervicais e poplíteos, histologicamente explicada pelo aumento do tamanho e do número dos folículos linfóides. Cães com LCV apresentaram maior reação medular dos linfonodos quando comparados com cães não-infectados (Giunchetti et al. 2007). Neste estudo evidenciou-se também a presença de colágeno circundando os folículos linfóides (Fig.2B), edema sub-

capsular (Fig.2C) e presença de infiltrado inflamatório na cápsula do linfonodo (Fig.2D).

As alterações observadas em cães infectados por *Leishmania chagasi* são semelhantes em vários aspectos às descritas para a leishmaniose visceral humana (LVH), com maior evidência nas alterações que incluem a hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (Keenan et al.1984). Pesquisas recentes enfocam importantes alterações observadas nos estudos histopatológicos dos linfonodos de cães infectados por *L. chagasi* (Keenan et al. 1984, Martinez-Moreno et al. 1993, Tafuri et al. 2001, Lima et al. 2004).

No Grupo Controle não se observaram alterações significativas do colágeno, sendo predominantes as fibras colágenas do tipo III (fibras reticulares, [Fig.3A e 3B]) como é descrito na literatura (Kierszbaum 2008). O colágeno III, constituído por fibras delgadas, menos birrefringentes e observadas em verde (Fig.3C) era pouco evidente, mostrando que nas áreas de lesão havia diminuição significativa ($p<0,05$) (Quadro 2) deste colágeno, sugerindo uma

Quadro 2. Quantificação média das fibras colágenas do tipo I e do tipo III do linfonodo poplíteo de 10 cães saudáveis e de 22 cães infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*^a

Grupo	Colágeno tipo I	Colágeno tipo III
Controle	53,8 ± 12,38	191,8 ± 17,24
Infectado	376,73 ± 57,35	78,0 ± 23,32
Grau de significância (p)	< 0,0001	< 0,0001

^aAs médias, na primeira e segunda linha, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de t-Student.

substituição do colágeno III pelo I, uma vez que todo o arcabouço de órgãos parenquimatosos, como por exemplo, o linfonodo, é constituído por fibras colágenas tipo III. Diferente dos resultados obtidos nesta pesquisa, estudos demonstraram predomínio de colágeno tipo III em torno de granulomas hepáticos de camundongos produzidos por *L. donovani* (Leite & Croft 1996). Na leishmaniose tegumentar murina, foi observado que na lesão primária (pele

plantar), o colágeno tipo I era substituído gradativamente por colágeno tipo III (Abreu-Silva et al. 2004). Entretanto, esses mesmos autores descreveram que havia predomínio de colágeno tipo I em linfonodo, confirmando a substituição do colágeno tipo III pelo tipo I, à semelhança do que foi observado neste estudo.

Através da análise do colágeno identificado pela técnica picosirius polarização observou-se no grupo infectado o predomínio significativo ($p > 0,05$) do colágeno tipo I que se caracteriza como um colágeno espesso, fortemente birrefringente e marcado em vermelho (Fig.3C e 3D) (Quadro 2). Há relatos de que promastigotas de *L. mexicana* podem se ligar à fibra colágena do tipo I (Lira et al. 1997), o que indicaria tropismo do parasita para este tipo de fibra e importante parte da patogênese. Entretanto, alguns autores (Abreu-Silva et al. 2004) sugerem que na infecção experimental crônica de camundongos com *L. amazonensis*, a fibra colágena do tipo III pode servir de

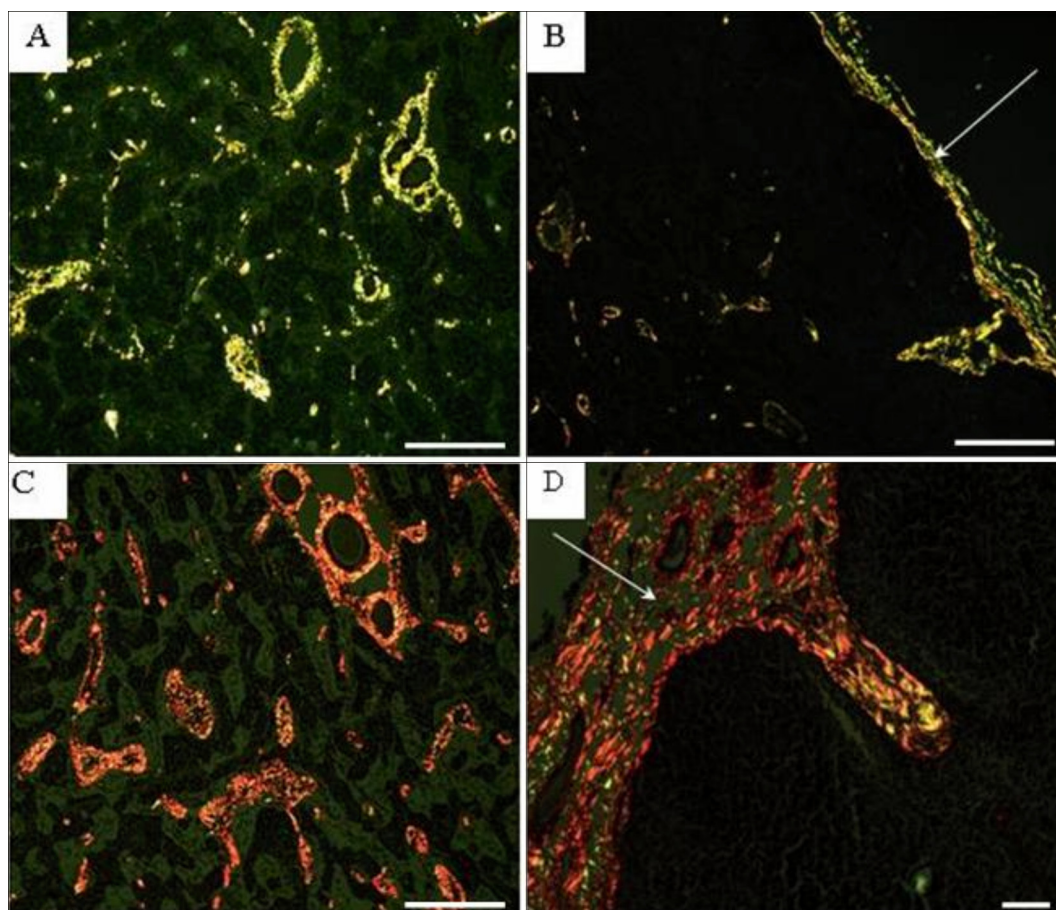


Fig.3. Corte longitudinal do linfonodo poplíteo de cão. (A) Região medular do linfonodo pertencente a um cão do Grupo Controle, evidenciando o predomínio de fibras colágenas do tipo III, marcadas em verde. Picosirius sob luz polarizada, obj.10x. Barra: 20µm. (B) Cápsula (seta), evidenciando o predomínio de fibras colágenas do tipo III, marcadas em verde. Picosirius sob luz polarizada, obj.4x. Barra: 20µm. (C) Região medular do linfonodo pertencente a um cão do Grupo Infectado com colágeno do tipo I, marcado em vermelho. Picosirius sob luz polarizada, obj.4x. Barra: 20µm. (D) Mesmo linfonodo mostrado em C, evidenciando espessamento da cápsula (seta). Picosirius sob luz polarizada, obj.10x. Barra: 100µm.

Quadro 3. Espessura média (mm) da cápsula e do seio subcapsular dos linfonodos poplíteos de 10 cães sadios e de 22 cães infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*^a

Grupo	Cápsula	Seio subcapsular
Controle	117, 4 ± 44,74	20, 7 ± 6,46
Infectado	122, 454 ± 70,42	23,1818 ± 5,47
Grau de significância (p)	0, 8369	0, 2684

^aAs médias, na primeira e segunda linha, não diferem significativamente entre si (p>0,05), pelo teste t-Student.

Quadro 4. Morfometria percentual média dos cordões medulares e dos seios medulares do linfonodo poplíteo de cães sadios e dos 22 cães infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*^a

Grupo	Cordão medular	Seio medular
Controle	41,82% ± 2,94	58,18% ± 2,94
Infectado	59,25% ± 1,69	40,75% ± 1,69
Grau de significância (p)	0, 0027	0, 0027

^aAs médias, nas colunas, diferem significativamente entre si (p<0,05), pelo teste de t-Student.

Quadro 5. Diâmetro médio (mm) dos folículos linfóides do linfonodo poplíteo de 10 cães sadios e dos 22 cães infectados naturalmente por *Leishmania (L.) chagasi*^a

Grupo	Diâmetro
Controle	221,5 ± 47,10
Infectado	263, 3182 ± 76, 82
Grau de significância (p)	0,12

^aAs médias, nas colunas, não diferem significativamente entre si (p>0,05), pelo teste t-Student.

suporte para os histiócitos parasitados por formas amastigotas em linfonodos poplíteos.

Os achados decorrentes das análises morfométricas da cápsula e seio subcapsular divergiram daqueles achados histopatológicos qualitativos, mostrando que estatisticamente o aumento na espessura de ambos os parâmetros analisados não foi significativo em nível de 5% (Quadro 3). Há relatos de que aproximadamente 96% das amostras analisadas de linfonodos de cães portadores de leishmaniose visceral apresentavam maior densidade da cápsula e presença de exsudato inflamatório crônico mononuclear associado à deposição de fibras colágenas (Lima et al. 2004). Neste estudo, pode-se observar, também, no grupo infectado, deposição de fibras colágenas espessas, colágeno tipo I na cápsula do grupo infectado (Fig.2D).

As quantificações percentuais dos elementos medulares, seios e cordões, revelaram que ocorreram significativas alterações (p<0,05) no grupo infectado quando comparado ao grupo padrão. Os resultados mostraram que há predomínio de cordões medulares no grupo infectado e a diminuição do seio medular neste grupo (Quadro 4). Linfonodos de cães infectados naturalmente por *L. chagasi* apresentam considerável hipertrofia de cordões medulares, provavelmente devido à hiperplasia histiocítica, linfóide (linfócitos B) e plasmocitária (Ferrer 2002, Lima 2004). Essas características também foram demonstra-

das na LVH (Veress et al. 1977) e em infecções experimentais em hamster (Corbett et al. 1992).

Apesar da avaliação histopatológica qualitativa de folículos linfóides dos cães portadores de leishmaniose visceral ter mostrado maior reatividade dos centros germinativos quando comparados com os cães sadios, as análises morfométricas comprovaram numericamente que não há diferença significativa em nível de 5% (p>0,05) (Quadro 5). De modo semelhante aos achados deste estudo, foi observado que em cães sintomáticos infectados por *L. chagasi*, ocorre atrofia da região cortical sugerindo que este fato aconteça como resultado da diminuição do número de células nos centros germinativos, ocasionada por um mecanismo imunorregulador, como por exemplo, a apoptose (Giunchetti et al. 2007). Em outro estudo (Lima 2004) é descrito que, histologicamente, os linfonodos de cães oligossintomáticos, especialmente o cervical superficial e o poplíteo, mostram hiperplasia nodular.

CONCLUSÕES

As análises da matriz extracelular do linfonodo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* mostraram que:

Ocorrem alterações acentuadas nos componentes da matriz extracelular caracterizadas pela substituição gradativa do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I.

Ocorre linfadenopatia difusa do linfonodo poplíteo.

Ocorre aumento da celularidade na região medular do linfonodo poplíteo, devido à hiperplasia dos cordões medulares.

Agradecimentos. - À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento do projeto; à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Maranhão (FAPEMA), pelo financiamento da bolsa de mestrado; aos Departamentos de Veterinária e de Biologia Geral da UFV; e ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), pela disponibilidade de instalações e laboratórios.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Silva A.L., Calabrese K.S., Mortara R.A., Tedesco R.C., Cardoso F.O., Carvalho L.O.P. & Gonçalves da Costa S.C. 2004. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. *Vet. Parasitol.* 128:385-390.
- Cardoso L. & Cabra M. 1998. *Leishmania* e leishmaniose canina. *Revta Port. Ciênc. Vet.* 93:119-170.
- Corbett C.E., Pinto-Paes P., Laurenti R.A., Andrade Jr M.D. & Duarte M.I.S. 1992. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.* 73:417-433.
- Desjeux P. 1992. Human leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. *World Health Stat. Q.* 45:312.
- Ferrer L. 2002. The pathology of canine leishmaniasis. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Seville, Spain, p.21-24.*
- Giunchetti R.C., Mayrink W., Carneiro C.M., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O.A., Marques M.J., Tafuri W.L. & Reis A.B. 2007. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 84:269-277.

- Gramiccia M. & Gradoni L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35:1169-180.
- Keenan C.M., Hendricks L.D., Lightner L. & Johnson A.J. 1984. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. Pathology. *Vet. Pathol.* 21:80-86.
- Kierszembbaum A.L. 2008. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia*. 2ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, p.310.
- Leite V.H. & Croft S.L. 1996. Hepatic extracellular matrix in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Int. J. Exp. Pathol.* 77:181-190.
- Lima W.G., Michalick M.S.M., Melo M.N. & Tafuri W.L. 2004. Canine visceral leishmaniasis: A histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.* 92:43-53.
- Lira R., Rosales-Encina J.L. & Arguelos C. 1997. *Leishmania mexicana* binding of promastigotes to type I collagen. *Exp. Parasitol.* 85:149-157.
- Martinez-Moreno A., Martinez-Cruz M.S. & Hernandez-Rodriguez S. 1993. Immunological and histological study of T- and B lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 51:49-59.
- MS 2006. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância, Ministério da Saúde, Brasília.
- Montes G.S. 1996. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol. Int.* 20:15-27.
- Tafuri W.L., De Oliveira M.R. & Melo M.N. 2001. Canine visceral leishmaniasis: A remarkable histopathologic picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.* 96:203.
- Veress B., Omer A., Satir A.A. & El Hassan A.M. 1977. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. *Immunology* 33:605-610.
- WHO (World Health Organization) 1990. Control of the leishmaniasis. Technical report series nº 793. Geneva, Switzerland.
- Yamada K.M. & Kemler R. 2002. Cell to cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:527-530.