

**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-graduação de Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES DOS LINFONODOS  
ASSOCIADAS ÀS FORMAS GRAVES DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**YURI DE JESUS SILVA**

**Salvador – Bahia**

**2019**



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-graduação de Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES DOS LINFONODOS  
ASSOCIADAS ÀS FORMAS GRAVES DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**YURI DE JESUS SILVA**

Orientador: Dr. Washington Luis Conrado dos Santos  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Karine Araújo Damasceno

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia  
2019**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

586c Silva, Yuri de Jesus.  
Caracterização morfológica das alterações dos linfonodos associadas às formas graves da Leishmaniose Visceral canina. / Yuri de Jesus Silva. - 2019.  
95 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular.

Dissertação (Mestrado em em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Leishmaniose Visceral Canina. 2. Órgãos linfoides. 3. Resposta imune.  
I. Título.

CDU 616.993.161:577.27

"CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES DOS LINFONODOS ASSOCIADAS ÀS FORMAS GRAVES DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA."

YURI DE JESUS SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 19 de fevereiro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima  
Professora Adjunta  
UFBA

  
Dra. Daniela Farias Lorangeira  
Professora Associada  
UFBA

  
Dr. Eduardo Antonio Gonçalves Ramos  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por mais uma etapa concluída em minha vida.

A Dr. Washington Luis Conrado dos Santos pela orientação e pela oportunidade de realizar este projeto.

A Dr<sup>a</sup> Karine Araújo Damasceno pela co-orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e incentivos constantes.

Ao grupo WLCS, em especial a Dr<sup>a</sup> Isadora Lima, Selma Matos e Jonathan Fontes por todo suporte nesta dissertação.

A Girlandia Bomfim e Thaynara Miranda, por toda amizade, carinho e ajuda com o processamento de amostras e dos cortes que foram utilizados neste trabalho.

A Isabele Coelho e Patrícia Luz por toda amizade, apoio e carinho.

A Elivani de Jesus, Sérgio Vasconcelos e Cristina Vasconcelos.

A todos os colegas e pesquisadores do Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LaPEM).

A Dr. Cláudio Figueira, Adriana Rangel, Arlene Lessa, Maria Lúcia Moreno e Márcio dos Santos, do Serviço de Microscopia Eletrônica do IGM.

A Ana Paula Pacheco, Lorena Magalhães e Andreia Estrela, do Serviço de Histotecnologia do IGM.

A todos do Setor de Patologia Veterinária do HOSPMEV / UFBA pelo fornecimento das amostras controles presentes nesta dissertação.

A Dr<sup>a</sup> Alessandra Estrela, Dr. Eduardo Ramos e Dr<sup>a</sup> Daniela Larangeira pelas contribuições na minha dissertação de mestrado.

A Bruna Leite, Paula Dantas, Lívia Brito, Kercia Pinheiro, Diana Dantas e Fernanda Carvalho pela amizade, pelos conselhos e pelo apoio nesta jornada.

A Tiago Mota pela ajuda na tradução do abstract contido nesta dissertação.

A Samantha, Maria Carolina, Maria Paula, Rafael Neto e Isac Patrick pela amizade e pelo suporte nos experimentos de imuno-histoquímica.

A coordenação da Pós-graduação, em especial a Simone Fortunato e Noélia dos Santos, por todo carinho e ajuda que obtive nesses dois anos de mestrado.

A Ana Maria Fiscina, Eliana Garcia, Daiana Santos e todos os funcionários da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Ana.

A FAPESB pela bolsa de mestrado.

Ao IGM por todo suporte que obtive para a realização desta dissertação.

A todos que torcem por mim, meu muito obrigado!

SILVA, Yuri de Jesus. Caracterização morfológica das alterações dos linfonodos associadas às formas graves da Leishmaniose Visceral canina. 2019. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica e manifesta-se por sinais clínicos inespecíficos, tal como esplenomegalia. O baço na LVC pode apresentar um processo inflamatório crônico e elevada densidade de parasitos, que comprometem principalmente os compartimentos do tecido linfóide, levando a sua desorganização. Cães naturalmente infectados podem apresentar linfadenomegalia com cordões medulares distendidos e infiltrado plasmocítico. Neste estudo examinaremos as alterações morfológicas dos linfonodos de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* e correlacionaremos essas alterações com o grau de desestruturação esplênica associada à enfermidade. **OBJETIVO:** Avaliar as características morfológicas e resposta imune tecidual em linfonodos poplíteos e suas associações com gravidade da leishmaniose visceral canina. **METODOLOGIA:** Linfonodos poplíteos de cães de uma área endêmica para LVC foram agrupadas de acordo com tipo de infecção (infecção ativa: cultura positiva/sorologia positiva para *Leishmania* e infecção não ativa cultura negativa/ sorologia negativa para *Leishmania*), e de acordo com o grau de organização da polpa branca esplênica: baço organizado (TIPO 1) e baço desorganizado (TIPO 3). Para o grupo controle, foram incluídos cinco linfonodos poplíteos de cães não portadores de LVC que evoluíram a óbito em um hospital veterinário de Salvador. Secções de linfonodos coradas em H&E foram avaliadas quanto ao constituinte celular, intensidade e distribuição das populações leucocitárias nas regiões da cápsula, seios e cordões medulares; foram realizadas mensurações na cápsula, seio subcapsular, centros germinativos e diâmetros dos cinco maiores folículos linfóides de cada animal. Secções de linfonodos foram marcadas através de imunohistoquímica com anticorpos anti-CD79 $\alpha$  (linfócitos B), anti-S100 (célula dendrítica), anti-CD68 (macrófagos), anti-IgG e anti-IgA (plasmócitos). Foram estimadas as densidades de todas as populações celulares por morfometria. **RESULTADOS:** Linfonodos de cães com infecção ativa, não ativa e grupo controle apresentaram um infiltrado crônico predominante em cápsula, seios e cordões medulares, variando somente quanto a sua intensidade e distribuição, não havendo diferenças estatísticas significativas. As alterações histopatológicas encontradas na cápsula, seios e cordões medulares dos linfonodos associadas com a desorganização da polpa branca esplênica não revelou diferenças estatísticas significativas. Linfonodos de cães com infecção ativa ( $p<0,05$ ) e não ativa ( $p<0,01$ ) apresentaram espessamento do seio subcapsular em relação ao grupo controle. Linfonodos de cães com infecção ativa apresentaram maiores áreas de folículos linfóides secundários ( $p<0,01$ ), maiores centros germinativos ( $p<0,01$ ), e maior diâmetro médio ( $p<0,05$ ) quando comparados aos linfonodos de cães com infecção não ativa. Linfonodos de cães com infecção ativa e com baço tipo 1 apresentaram maior densidade de macrófagos na zona paracortical ( $p<0,01$ ), maior densidade de células B na zona cortical ( $p<0,001$ ) e paracortical ( $p<0,001$ ) em comparação aos linfonodos de cães com baço tipo 3. Linfonodos de cães com baço TIPO 3 apresentaram maior densidade de células dendríticas ( $p<0,05$ ) na zona cortical quando comparados aos linfonodos de cães com baço TIPO 1. Linfonodos de cães com infecção não ativa apresentaram maiores densidades de todos os marcadores em relação ao grupo controle. **CONCLUSÃO:** Os dados demonstram significativa desorganização estrutural em linfonodos poplíteos de cães acometidos por LVC, contudo essas alterações não estão associadas a desorganização do tecido esplênico em casos mais graves da doença.

**PALAVRAS CHAVES:** Leishmaniose Visceral Canina, Órgãos linfóides, Plasmocitose, Resposta imune.



SILVA, Yuri de Jesus. Morphological characterization of lymph nodes changes associated with severe forms of canine visceral leishmaniasis. 2019. 95 f. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) –Institute Gonçalo Moniz, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a systemic disease and it manifests itself by non-specific clinical signs, such as splenomegaly. In the CVL, the spleen structure can present chronic inflammatory infiltration and high parasite load, which mainly compromise the splenic lymphoid tissue compartments, leading to disorganization. Naturally infected dogs can present lymphadenomegaly as consequence of distended spinal cords and plasmacytic infiltrate. In this study we will examine the morphological alterations of the lymph nodes of naturally infected dogs with *Leishmania infantum* and correlate these changes with the degree of splenic disruption associated with the disease. **OBJECTIVE:** To characterize the morphological changes and tissue immune response of the lymph nodes associated with severe forms of CVL. **METHODOLOGY:** Popliteal lymph nodes of dogs from a CVL endemic area were grouped according to the infection type (active infection: positive culture/positive serology for *Leishmania* and non-active infection: negative culture/negative serology for *Leishmania*), and according to the splenic white pulp's disorganization degree: organized spleen (TYPE 1) and disorganized spleen (TYPE3). For the control group, five popliteal lymph nodes of dogs that died in a veterinary hospital in Salvador were included. Lymph node sections colored with H&E were evaluated for the infiltrate's cellular constituent, its intensity and distribution in the regions of the capsule, sinuses and medullary cords. Measurements in the capsule, subcapsular sinus, germinal centers and the diameter of the five biggest lymphoid follicles of each animal were performed. The lymph nodes' sections were marked through immunohistochemistry with anti-CD79 $\alpha$  (B-lymphocytes), anti-CD68 (macrophages), anti-IgG and anti-IgA (plasmacytes) antibodies. The densities of all cellular populations were estimated by morphometry. **RESULTS:** The lymph nodes of dogs of the control group and with active and non-active infection presented a predominant chronic infiltrate in the capsule and medullary cords and sinus, not having significant statistical significance. The histopathological changes found in the lymph node capsule, sinuses, and medullary cords associated with splenic white pulp disorganization revealed no statistically significant differences. Lymph nodes of dogs with active infection ( $p < 0.05$ ) and non-active ( $p < 0.01$ ) presented higher dilation of the subcapsular sinus in relation to the control group. Lymph nodes of dogs with active infection presented higher areas of secondary lymphoid follicle ( $p < 0.01$ ), higher germinal centers ( $p < 0.01$ ), and higher mean diameter ( $p < 0.05$ ) in comparison with lymph nodes of dogs with non-active infection. Lymph nodes of dogs with active infection and type 1 spleen presented higher macrophage density in the paracortical zone ( $p < 0.01$ ), higher B-lymphocyte cell density in the cortical ( $p < 0.001$ ) and paracortical ( $p < 0.001$ ) zones in comparison with the lymph nodes of dogs with type 3 spleen. Lymph nodes of dogs with type 3 spleen presented higher dendritic cell density ( $p < 0.05$ ) in the cortical zone when compared with lymph nodes of dogs with type 1 spleen. Lymph nodes of dogs with non-active infection presented higher densities of all markers in relation to the control group. **CONCLUSION:** Our data demonstrate a significant structural disorganization in the lymph nodes of dogs afflicted with CVL, though these changes are not associated to the disorganization of the splenic tissue in severe cases of the disease.

**KEY WORDS:** Canine Visceral Leishmaniasis, Lymphoid organs, Plasmacytosis, Immune Response.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fotografia do corte longitudinal do linfonodo poplíteo canino.....	21
Figura 2. Fotografias representativas de polpa branca esplênica organizada.....	26
Figura 3. Desenho experimental.....	27
Figura 4. Corte longitudinal do linfonodo de cão naturalmente infectado por <i>Leishmania infantum</i> .....	29
Figura 5. Frequência das alterações histopatológicas em linfonodos em cães com infecção ativa e não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle .....	37
Figura 6. Frequência da histiocitose em seios medulares em linfonodos de cães com infecção ativa e não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle .....	38
Figura 7. Fotografias representativas de linfonodos de cães com infecção ativa, não ativa para <i>Leishmania</i> e do grupo controle em diferentes estruturas .....	39
Figura 8. Frequência das alterações histopatológicas em linfonodos em cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> associadas a organização da polpa branca esplênica.....	43
Figura 9. Frequência da histiocitose em seios medulares em linfonodos de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> associada a organização da polpa branca esplênica .....	44
Figura 10. Frequência das alterações histopatológicas em linfonodos em cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> associadas a organização da polpa branca esplênica .....	49
Figura 11. Frequência da histiocitose em seios medulares em linfonodos de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> associada a organização da polpa branca esplênica .....	50
Figura 12. Análise morfométrica dos linfonodos poplíteos de cães com infecção ativa, não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e controle .....	52
Figura 13. Análise morfométrica de linfonodos poplíteos de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> e com baço TIPO 1 e TIPO 3 e controle.....	53
Figura 14. Análise morfométrica de linfonodos poplíteos de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e com baço TIPO 1 e TIPO 3 e controle.....	54
Figura 15. Delineamento experimental para Imuno-histoquímica.....	55
Figura 16. Densidade de plasmócitos secretores de IgG em linfonodos de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> e com baço TIPO1, TIPO 3 e grupo controle.....	56

Figura 17. Densidade de plasmócitos secretores de IgA em linfonodos de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> e com baço TIPO1, TIPO 3 e grupo controle.....	56
Figura 18. Fotografia da distribuição de plasmócitos secretores de IgA e IgG em linfonodos de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle.....	58
Figura 19. Densidade de macrófagos (CD68) em linfonodos de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle.....	58
Figura 20. Densidade de células dendríticas(S-100) em linfonodos de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle.....	59
Figura 21. Densidade de células B em linfonodos (CD79 $\alpha$ ) de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle.....	59
Figura 22. Fotografias da distribuição de macrófagos (CD68), células dendríticas (S-100) e células B (CD79 $\alpha$ ) em linfonodos de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> e com baço TIPO1, TIPO 3 e grupo controle.....	60
Figura 23. Densidade de plasmócitos secretores de IgG em linfonodos de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e com baço TIPO1, TIPO 3 e grupo controle .....	61
Figura 24. Densidade de plasmócitos secretores de IgA em linfonodos de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e com baço TIPO1, TIPO 3 e grupo controle.....	62
Figura 25. Fotografia da distribuição de plasmócitos secretores de IgA e IgG em linfonodos de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle.....	63
Figura 26. Densidade de macrófagos (CD68) em linfonodos de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle.....	64
Figura 27. Densidade de células dendríticas(S-100) em linfonodos de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle.....	65
Figura 28. Densidade de células B em linfonodos (CD79 $\alpha$ ) de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle.....	65
Figura 29. Fotografias da distribuição de macrófagos (CD68), células dendríticas (S-100) e células B (CD79 $\alpha$ ) em linfonodos de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e com baço TIPO1, TIPO 3 e grupo controle.....	6

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados na fenotipagem de plasmócitos.....	30
Tabela 2. Anticorpos utilizados na fenotipagem celular.....	31
Tabela 3. Características gerais da amostra de animais de uma área endêmica para leishmaniose visceral.....	34
Tabela 4. Características gerais e clínicas de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> associada a organização da polpa branca esplênica .....	41
Tabela 5. Características gerais e clínicas de cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> associada a organização da polpa branca esplênica.....	46
Tabela 6. Alterações histopatológicas em cães com infecção ativa e não ativa por <i>Leishmania infantum</i> e grupo controle .....	83
Tabela 7. Alterações histopatológicas em linfonodos de cães com infecção ativa por <i>Leishmania infantum</i> associada a organização da polpa branca esplênica .....	84
Tabela 8. Alterações histopatológicas em cães com infecção não ativa por <i>Leishmania infantum</i> associada a organização da polpa branca esplênica .....	86
Tabela 9. Exames hematológicos e bioquímicos de cães com infecção ativa e não ativa para <i>Leishmania infantum</i> levando em consideração a desorganização da polpa branca esplênica.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>CD</b>	Nomenclatura sistematizada de moléculas (do inglês <i>cluster differentiation</i> )
<b>CCR</b>	Receptor de quimiocinas contendo 2 resíduos de cisteína juntos
<b>CCL</b>	Ligantes de quimiocinas contendo 2 resíduos de cisteína juntos
<b>CXCR</b>	Receptores de quimiocina com mais de dois resíduos de cisteína juntos
<b>CXC</b>	Ligantes de quimiocinas com mais de 2 resíduos de cisteína juntos
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina (cromógeno usado da revelação de imunohistoquímica)
<b>DC</b>	Células dendríticas (do inglês <i>Dendritic Cell</i> )
<b>ELISA</b>	Ensaio imuno enzimático (do inglês <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> )
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidade (do inglês <i>High Density Lipoproteins</i> )
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LVC</b>	Leishmaniose Visceral Canina
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>qPCR</b>	Reação da cadeia da polimerase quantitativa (do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
<b>ZC</b>	Zona Cortical
<b>ZM</b>	Zona Medular
<b>ZP</b>	Zona Paracortical

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL	15
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO LV	15
2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	16
2.3.1 <i>Etiopatogenia</i>	17
2.3.2 <i>Manifestações clínicas da LVC</i>	17
2.3.3 <i>Achados em necropsia</i>	18
2.3.4 <i>Alterações esplênicas na LVC</i>	19
2.4 LINFONODO	20
2.4.1 <i>Estrutura e organização</i>	20
2.4.2 <i>Alterações em linfonodos na LVC</i>	21
2.4.3 <i>Resposta imunológica no linfonodo</i>	22
<b>3. OBJETIVOS</b>	24
3.1 GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<b>4. METODOLOGIA</b>	25
4.1 SELEÇÃO DE CÃES E SUBGRUPOS COM BASE NA MORFOLOGIA ESPLÊNICA	25
4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	27
4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA ESTRUTURAL DOS LINFONODOS	28
4.4 FENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DO LINFONODO	29
4.4.1 <i>Plasmócitos</i>	30
4.4.2 <i>Células dendríticas, macrófagos e linfócitos B</i>	31
4.4.3 <i>Contagem de células</i>	31
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
<b>5. RESULTADOS</b>	33
5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS CÃES INCLUSOS NA ANÁLISE	33

5.2	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA DOS LINFONODOS.....	36
5.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE AS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS LINFONODOS COM A DESORGANIZAÇÃO ESPLÊNICA CAUSADA PELA INFECÇÃO DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> .....	37
5.3.1	<i>Características gerais e clínicas dos animais com infecção ativa baço TIPO 1 e TIPO 3</i> .....	40
5.3.2	<i>Com infecção ativa e tipo de organização da polpa branca esplênica</i> .....	42
5.3.3	<i>Características gerais e clínicas dos animais com infecção não ativa baço TIPO 1 e TIPO 3</i> .....	43
5.3.4	<i>Com infecção não ativa e tipo de organização da polpa branca esplênica</i> .....	48
5.4	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS LINFONODOS DE CÃES INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> .....	51
5.4.1	<i>Em relação ao tipo de infecção</i> .....	51
5.4.2	<i>Em relação ao tipo de infecção associada ao tipo de organização da polpa branca esplênica</i> .....	53
5.5	ANÁLISE MORFOMÉTRICA QUANTITATIVA DA DENSIDADE CELULAR ..	54
5.5.1	<i>Com infecção ativa e com base na desorganização da polpa branca esplênica</i> .....	55
5.5.2	<i>Com infecção não ativa</i> .....	60
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
7.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	74
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75
	<b>APÊNDICES</b> .....	84

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais negligenciadas causada por protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania* que são transmitidas aos seres humanos durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmeas infectadas (OMS,2017). A leishmaniose visceral (LV) é considerada a forma mais grave e quase sempre fatal, caso não seja tratada. Anualmente, estima-se que ocorra 500.000 casos novos de LV, dos quais 90% incidem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (OMS,2017).

Nas Américas, a LV tem distribuição em 12 países e cerca de 96% dos casos nesta região, estão concentrados no Brasil (OPAS,2018). 90% ocorre predominantemente nos estados da Bahia, Minas Gerais, Ceará e Maranhão (SINAN/SVS/MS,2017). Nos centros urbanos, a enfermidade é mantida por um ciclo de infecção que envolve seres humanos, o vetor flebotomíneo (LAINSON & RANGEL, 2005) e mamíferos, como o cão (*Canis familiaris*). O cão é apontado como o principal reservatório urbano da LV devido à sua relação próxima com os humanos (DANTAS-TORRES, 2007), por ter intenso parasitismo cutâneo, aparentemente favorecendo a infecção de flebotomos que pode transmitir ao homem (QUEIROZ *et al.*, 2011). Outro fator importante é que a maioria dos cães, permanecem assintomáticos por longos períodos de tempo, o que dificulta o diagnóstico e contribui para a manutenção do animal infectado na região e a transmissão da leishmaniose (ALVAR *et al.*, 2004; BRASIL, 2006; DINIZ *et al.*, 2008).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica e se manifesta por sinais clínicos inespecíficos. Os principais achados no exame físico incluem febre, palidez das mucosas, lesões cutâneas, apatia, letargia, sinais oculares, alopecia, onicogribose, perda de peso, linfadenomegalia, além de esplenomegalia (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Durante o curso da LVC, a estrutura do baço pode apresentar alterações importantes, caracterizadas pelo infiltrado inflamatório crônico e a elevada densidade de parasitos, que comprometem, principalmente os compartimentos de polpa branca (REIS *et al.*, 2009). Estas mudanças combinam um aumento no tamanho e alteraram a distribuição dos componentes celulares. As populações de célula sofrem mudança, e os locais adequados de interações de célula e diferenciação desaparecem ou substancialmente são desestruturados (HERMIDA *et al.*, 2018).



Alterações arquiteturais da polpa branca do baço foram descritas em modelos experimentais de infecções por *L. infantum* em camundongos (ENGWERDA *et al.*, 2002).

A existência de uma desestruturação do tecido linfóide esplênico também foi demonstrada em cães naturalmente infectados com *L. infantum* nos quais se verificou que cães susceptíveis, com teste Montenegro negativo e cultura esplênica positiva, apresentavam folículos linfóides menores e em número menor, assim como uma alteração no padrão estrutural dos folículos linfóides. Entre os anos de 2004 e 2010, dados clínicos e laboratoriais de 206 cães de uma área endêmica para LV foram revisados pelo nosso grupo de pesquisa. Secções de baço canino foram analisadas e classificadas, seguindo os parâmetros definidos previamente por Santana e colaboradores (2008): baço bem organizado (baço tipo 1), quando se distingue a bainha periarteriolar de linfócitos, centro germinativo, zona do manto e a zona marginal; ligeiramente desorganizado (baço tipo 2), quando a polpa branca está evidente, mas suas regiões são pobremente individualizadas e distintas; ou extensivamente desorganizado (baço tipo 3) quando a estrutura folicular está raramente distinta da polpa vermelha e área de células T (SANTANA *et al.*, 2008).

A associação entre a gravidade da leishmaniose visceral canina e a desorganização do tecido linfóide esplênico é ainda mais evidente em animais com a cultura do baço positiva para o parasito. Outros sinais clínicos como conjuntivite e úlcera também foram mais frequentes nos animais com baço tipo 3 do que nos animais com baço tipo 1. Esses achados mostram claramente que a desestruturação do tecido linfóide esplênico está associada com apresentação clínica mais grave da leishmaniose visceral canina (LIMA *et al.*, 2014).

Em paralelo a esplenomegalia, a linfadenopatia é um aspecto notável na LVC (LIMA *et al.*, 2004; GIUNCHETTI *et al.*, 2008). Microscopicamente, linfonodos de cães naturalmente infectados podem apresentar linfadenite difusa, cordões medulares distendidos, folículos linfóides irregularmente deslocados para áreas medulares dos linfonodos, e na região cortical folículos linfóides com centros germinativos reativos e infiltrado plasmocítico, evidenciando uma desorganização estrutural (KONDO *et al.*, 2009). Nos cães sintomáticos, as principais células encontradas nos linfonodos são plasmócitos, seguidos de macrófagos e neutrófilos. A presença de plasmócitos sugere a ativação e proliferação policlonal dos linfócitos B, que se aglomeram no córtex, centro germinativo e cordões medulares dos linfonodos (MOREIRA *et al.*, 2010).

Alguns estudos relatam características histopatológicas semelhantes entre todos os linfonodos de cães com leishmaniose, independentemente do estágio clínico do animal e a localização anatômica do linfonodo. Normalmente, linfadenite crônica é observada, envolvendo toda a arquitetura do linfonodo, com hiperplasia na região cortical, histiocitose nos cordões sinoidais e cordões medulares com plasmócitos também pode ser comumente observada em cães infectados (LIMA *et al.*, 2004; GIUNCHETTI *et al.*, 2008). A plasmocitose, caracterizada pelo aumento do número de plasmócitos, é outro achado comum na LV e, descrita pelo nosso grupo no baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, associada com a desorganização do tecido linfóide (CORBEIL *et al.*, 1976, MARTINEZ-MORENO *et al.*, 1995, SANTANA *et al.*, 2008). Recentemente, demonstramos que na LVC grave a desorganização da polpa branca do baço está associado a maior frequência e intensidade de plasmócitos acumulados neste órgão (SILVA-O'HARE *et al.*, 2016). Até o momento não se sabe, se a plasmocitose também é uma possível causa ou consequência da desorganização linfonodal.

Sendo assim, pouco se conhece na literatura sobre os fatores que levam a desorganização morfológica do parênquima do linfonodo, bem como sobre o fenótipo dos tipos celulares envolvidos. Desta forma, faz-se necessário investigar a relação entre as características morfológicas e o perfil fenotípico dos constituintes celulares envolvidos na desestruturação deste órgão linfóide.

A nossa hipótese é que existe uma desestruturação dos compartimentos dos linfonodos que varia de acordo com a intensidade da infecção e com a gravidade da doença, refletida pela desorganização esplênica em cães com leishmaniose visceral.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

Leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias causadas por diversas espécies de protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, que são consideradas zoonóticas (WERNECK 2014; OMS 2017). Inclui nesse grupo as seguintes formas: cutânea e mucocutânea (LC), que afetam a pele ou a junção cutânea e mucocutânea, podendo curar-se espontaneamente deixando cicatrizes com desfigurações; e a leishmaniose visceral (LV), que envolve órgãos internos e é fatal quando não tratada (MURRAY *et al.*, 2005).

Em 2017, 20.792 dos 22.145 (94%) casos notificados a OMS ocorreram: no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (OMS 2017). Nas Américas, casos de LV foram registrados desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No período de 2001-2016 foram reportados 55.530 casos humanos de LV nas Américas com uma média anual de 3.457 casos (OPAS OMS 2017). Essa doença já foi descrita pelo menos em 12 países, sendo que o Brasil, Argentina e Paraguai, concentram 78% dos casos (LAINSON e RANGEL, 2005; WHO 2017).

No Brasil, casos de LV já foram notificados em 21 Estados, atingindo as cinco regiões do país (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008). Na região Nordeste localizam-se as principais zonas endêmicas, com 1.806 casos notificados em 2015 (SINAN/SVS/MS,2017).

Entre os principais fatores de risco socioambientais que contribuem para a infecção por *Leishmania* destacam-se: a pobreza, desnutrição e alterações climáticas, todos envolvidos com baixa de imunidade das populações ou na adaptação do vetor a novos ambientes urbanos (OMS, 2016). A leishmaniose é uma das principais doenças infecciosas que afetam as populações mais pobres do mundo, vivendo principalmente em áreas rurais e suburbanas (ALVAR *et al.*, 2006).

### 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO LV

A *Leishmania infantum* é um protozoário bifásico que se apresenta em duas formas distintas durante seu ciclo de vida (ALEXANDER e RUSSEL, 1992). A forma promastigota encontra-se no interior do trato digestório dos vetores flebotomíneos

(KILLICK KENDRICK e RIOUX, 1991). A forma amastigota, encontra-se no hospedeiro vertebrado, sendo encontrada dentro de um fagolisossomo de células do sistema monocítico fagocitário, principalmente em macrófagos (KAYE e SCOTT, 2011).

Esse protozoário necessita no seu ciclo biológico de um inseto vetor, sendo transmitidos ao hospedeiro vertebrado pela picada de fêmeas hematófagas infectadas pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo o vetor do gênero *Lutzomyia* (FRANÇA, 2003) responsável pela transmissão das leishmanioses no Novo Mundo (YOUNG & DUNCAN, 1994).

O ciclo biológico se inicia quando as fêmeas do inseto vetor se alimentam de algum hospedeiro infectado e tornam-se infectadas (NEVES, 2006; ROMICH, 2008) Células do sistema fagocítico mononuclear da pele do hospedeiro vertebrado, são infectadas durante o repasto sanguíneo do vetor (KILLICK-KEENDRICK, 1999).

No interior de macrófagos, formas promastigotas se transformam nas formas amastigotas que se multiplicam intensamente por divisão binária (NEVES, 2006). O número elevado de parasitos pode causar lise desses macrófagos, liberando formas amastigotas, disseminando para outras células do sistema fagocítico mononuclear e diferentes órgãos do hospedeiro vertebrado (NEVES, 2006).

### 2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença fatal grave em cães, sendo estes os animais de companhia mais frequentemente encontrados nas residências de grande número de famílias em países desenvolvidos e em desenvolvimento. A saúde de cães de estimação é considerada uma grande preocupação para seus tutores, uma vez que esta espécie é o principal reservatório do parasita para humanos (GRAMICCIA e GRADONI, 2005).

Algumas raças de cães como Boxer, Cocker spaniel, Rottweiler e pastor alemão parecem ser mais suscetíveis ao desenvolvimento a doença (SIDERIS *et al.*, 1999; FRANCA-SILVA *et al.*, 2003) enquanto outras, como o Hindu Ibizian, raramente desenvolver sinais clínicos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2000).

Cães infectados são encontrados em todos os focos onde ocorre a doença humana, sendo deste modo, o principal elo na cadeia de transmissão (MOREIRA JR. *et al.*, 2004). Diante desses fatos, uma das principais medidas de controle da LV no

Brasil preconizada pelo Ministério da Saúde (MS) consiste em identificar e eutanasiar os animais que apresentam sorologia positiva (BRASIL, 2014), essa medida é controversa e a experiência brasileira mostrou que a eutanásia de 176.000 cães soropositivos durante o período 1990-1997, não foi associado à redução no número de casos humanos e caninos de doenças e infecções (COURA-VITAL *et al.*, 2014; COURTENAY *et al.*, 2002; DIETZE *et al.*, 1997; GRIMALDI *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Etiopatogenia

Uma vez que as promastigotas de *L.infantum* são inoculadas na derme do cão, a infecção pode evoluir para uma forma limitada, sendo controlada localmente por macrófagos e outras células da defesa; não disseminada, quando os parasitas conseguem acometer a pele, no linfonodo e no baço, caracterizando um quadro de infecção subclínica; ou ainda disseminada, onde o parasita se espalha por todo organismo, podendo levar o aparecimento de manifestações clínicas (BANETH *et al.*, 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011).

Após a picada do inseto vetor a *L. infantum* se distribui rapidamente nos linfonodos e baço, sucessivamente alcançando os rins e o fígado (MOREIRA *et al.*, 2007). Finalmente o parasito se dissemina para os órgãos reprodutivos, pele, trato digestório e respiratório do hospedeiro (MOLYNEUX e ASHFORD,1983).

### 2.3.2 Manifestações clínicas da LVC

A LVC é uma doença sistêmica que pode envolver qualquer órgão, tecido ou fluido biológico, sendo manifestada por sinais clínicos inespecíficos. Os principais achados encontrados na LVC clássica incluem: lesões de pele, perda de peso progressiva, atrofia muscular, intolerância ao exercício, letargia, diminuição de apetite, linfadenomegalia generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia, lesões oculares, epistaxe, onicogribose, claudicação, vômito e diarreia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 1999; BANETH *et al.*, 2008).

De acordo com Mancianti e colaboradores (1988), os cães podem ser classificados em: assintomáticos, quando os animais encontram-se aparentemente saudáveis; oligossintomáticos, quando apresentam alguns sinais como ulcerações cutâneas observadas nas pontas dos ouvidos e nas áreas periorbitárias, moderada

perda de peso e alopecia localizada; por fim, os sintomáticos, quando os animais apresentam um ou mais sinais clínicos típicos de LVC, tais como ulcerações cutâneas em todo o corpo, cegueira, perda de peso severa (anorexia), onicogrifose, dermatite furfurácea, alopecia geral, ceratoconjuntivite, progresso em direção ao estado geral de morbidade e morte. Esta classificação tem um valor limitado, uma vez que não considera alterações clínico-patológicas e desconsidera cães com disfunção orgânica generalizada sem manifestações visíveis aparentes (SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008).

Solano-Gallego e colaboradores (2009) apontam que a definição de cães com leishmaniose clínica deve ser adotada quando os mesmos apresentam sinais clínicos e/ou anormalidades clinicopatológicas e confirmação de infecção *por L. infantum*. Cães com infecção subclínica ou cães assintomáticos são definidos como aqueles que não apresentam sinais clínicos no exame físico nem anormalidades clínico-patológicas por exames laboratoriais de rotina (hemograma, perfil bioquímico e análise de urina), mas apresentam uma infecção confirmada *por L. infantum* (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de sinais clínicos na LVC está associado a densidade do parasito em compartimentos específicos como: pele (DE ALMEIDA FERREIRA *et al.*, 2012), linfonodos (REALE *et al.*, 1999), baço (SOLCÀ *et al.*, 2012) e medula óssea (REIS *et al.*, 2006). Independente do estado clínico, a pele e o baço são os principais locais de alta densidade parasitária durante a LVC, e a carga parasitária avaliada na medula óssea e no baço foram considerados bons marcadores parasitológicos confiáveis para decodificar o estado clínico na LVC (REIS *et al.*, 2006).

### 2.3.3 Achados em necropsia

Ao exame externo, na pele se observam lesões descamativas, ulceradas, crostosas, pelos opacos, alopecia local ou generalizada, sendo comumente observadas áreas alopécicas e ulceradas ao redor dos olhos, focinho, orelhas, e dorso (FONDEVILA *et al.*, 1997, SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997), rarefação de pelos na orelha, focinho, pescoço e membros distais (VIADANNA *et al.*, 2011).

Pode ser observada coloração amarelada das mucosas e do subcutâneo que caracterizam icterícia (POCAI *et al.*, 1998), bem como edema subcutâneo principalmente nos membros distais (GENARO, 1995). Os olhos geralmente

apresentam blefarite, ceratoconjuntivite, ou apenas conjuntivite, uveíte, sinéquia, edema de córnea e outras alterações (CIARAMELLA *et al.*, 1997; FERRER, 1999; BRITO *et al.*, 2004; VIADANNA *et al.*, 2011).

O fígado pode estar aumentado com bordas arredondados e com evidenciação do padrão lobular. O baço e os linfonodos também podem apresentar-se com volume e tamanho aumentados (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007).

Foi observado nos rins, áreas de nefrite da cápsula fibrosa em sua superfície visceral, áreas de depressão irregular na superfície, áreas de infarto e de hemorragia, alterações na coloração do parênquima renal, congestão e isquemia. (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; FERRARI *et al.*, 2010).

#### 2.3.4 Alterações esplênicas na LVC

Além de alterações macroscópicas comuns, como o aumento de volume do baço, foi observado em animais sintomáticos um aumento do número de amastigotas no baço, especialmente dispersos na polpa vermelha ou adjacentes a cápsula (TRYPHONAS *et al.*, 1977; KEENAN *et al.*, 1984; TAFURI *et al.*, 1996; REIS *et al.*, 2006; SANCHEZ *et al.*, 2004). Cães sintomáticos ou não, podem apresentar alterações na estrutura da polpa branca com modificação da morfologia dos folículos linfóides que não exibem mais o mesmo padrão típico com seus centros germinativos (TAFURI *et al.*, 2001).

A desorganização esplênica tem sido alvo de estudo para compreensão do perfil de susceptibilidade e resistência na LVC. Santana e colaboradores (2008) ao investigar 72 cães semi domiciliados no município de Jequié, área endêmica da LVC na Bahia, mostrou que existe uma desorganização do tecido linfóide esplênico, maior ocorrência de periesplenite, presença de granulomas, maior número de plasmócitos na polpa vermelha, além de presença de formas amastigotas de *Leishmania* em área de região subcapsular e polpa vermelha. Foi observado também uma diminuição do número e tamanho de folículos linfóides, além da diminuição dos centros germinativos e zona marginal no baço de cães naturalmente infectados. Esses resultados sugeriram que tais alterações no tecido esplênico estão associadas a um perfil de susceptibilidade a doença (SANTANA *et al.*, 2008).

Entre os anos de 2004 e 2010, dados clínicos e laboratoriais de 206 cães de uma área endêmica para LV foram revisados pelo nosso grupo de pesquisa. Secções de

baço canino foram analisadas e classificadas, seguindo os parâmetros definidos previamente por Santana e colaboradores (2008): baço bem organizado, quando se distingue a bainha periarteriolar de linfócitos, centro germinativo, zona do manto e a zona marginal (baço tipo 1); ligeiramente desorganizado, quando a polpa branca está evidente, mas suas regiões são pobremente individualizadas e distintas (baço tipo 2); ou extensivamente desorganizado quando a estrutura folicular está raramente distinta da polpa vermelha e área de células T (baço tipo 3).

Estas modificações no parênquima esplênico parecem estar relacionadas com a susceptibilidade a LVC e progressão da infecção. Inicialmente ocorre a hiperplasia, que pode evoluir para atrofia e profunda desorganização estrutural do tecido linfoide associado a plasmocitose nas formas graves e terminais da doença (VERESS *et al.*, 1977; VERESS *et al.*, 1983; SANTANA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; HERMIDA *et al.*, 2018).

Lima e colaboradores (2014) demonstraram que a gravidade da LVC está associada a desorganização esplênica em cães que apresentaram cultura de baço positiva. Além disso, animais com sinais clínicos mais graves de LVC, revelaram conseqüentemente maior desorganização esplênica, mostrando assim que essa desestruturação está associada a uma apresentação de quadro clínico mais grave (LIMA *et al.*, 2014).

## 2.4 LINFONODO

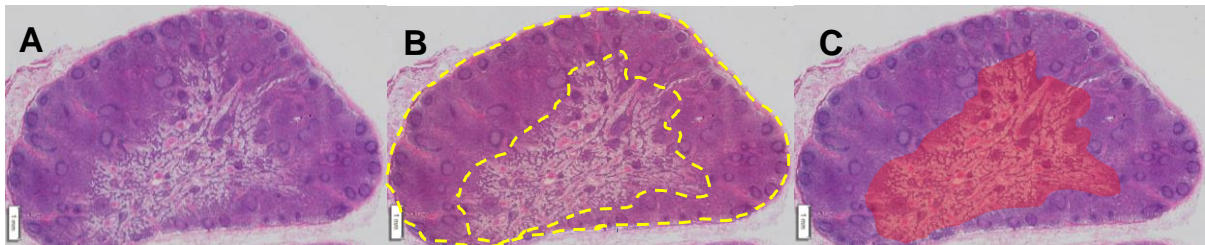
### 2.4.1 Estrutura e organização

Os linfonodos são órgãos linfoides secundários vascularizados e capsulados, constituídos por tecido linfoide encontrados ao longo dos vasos do pescoço, em grande quantidade no tórax, abdômen e especialmente no mesentério. Possuem tamanhos variáveis, sendo seu parênquima sustentado por um arcabouço de células reticulares e fibras reticulares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Em uma secção transversal dos linfonodos, observa-se três áreas principais: a região cortical, (área mais externa), onde encontram-se os folículos linfoides que estão quase sempre ausentes nos animais livres de infecção e neonatos não estimulados. Com o estímulo antigênico, formam-se os folículos linfoides que inicialmente não apresentam centros germinativos e são denominados de folículos linfoides primários.



Com estímulo antigênico contínuo, os centros germinativos, desenvolvem-se e esses folículos são denominados de folículos linfoides secundários; região paracortical, zona intermediária entre a cortical e medular, rica em linfócitos T; e região medular é a área, mais interna, consiste em dois componentes: cordões medulares contendo linfócitos e macrófagos (em linfonodo imunologicamente estimulado, plasmócitos) e os seios medulares, rodeados por macrófagos que ativamente fagocitam material estranho e bactérias, além disso também recebem a linfa que vem da cortical e comunica-se com os vasos linfáticos eferentes, pelos quais a linfa sai do linfonodo (MCGAVIN & ZACHARY,2009).



**Figura 1.** (A) Corte longitudinal do linfonodo poplíteo canino (B) Delimitação da região cortical tracejada de amarelo, sendo a zona paracortical entre os folículos linfoides; (C) Zona medular sombreada de vermelho. Hematoxilina-eosina, obj 20x

#### 2.4.2 Alterações em linfonodos na LVC

A linfadenomegalia generalizada pode ser observada em diversas cadeias de linfonodos de cães infectados com *Leishmania infantum* e alguns estudos relatam características histopatológicas semelhantes entre todos os linfonodos de cães com leishmaniose, independentemente do estágio clínico do animal e a localização anatômica do linfonodo (LIMA *et al.*, 2004). Outras características macroscópicas podem ser notadas ao corte, como lesões hipertróficas tanto na região cortical quanto na medular (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007).

Como já foi verificado em baço de cães infectados, os linfonodos também apresentam espessamento de cápsula. Há uma presença de infiltrado inflamatório crônico, predominantemente com macrófagos associado a um depósito de colágeno (LIMA *et al.*, 2004). Esta mesma deposição de colágeno foi evidenciada por Kondo e colaboradores (2009) ao estudar cães naturalmente infectados, nas quais a presença de colágeno tipo III foi substituída pelo colágeno tipo I, além de edema subcapsular e a presença de infiltrado inflamatório na cápsula de linfonodos destes cães.

Pode ser vista também capsulite com a presença de pequena quantidade de neutrófilos permeando. No seio subcapsular, é constatada dilatação causada pelo preenchimento por células mononucleares ou por edema. Há ainda, hiperplasia folicular moderada na região cortical (COSTA *et al.*, 2008). Em se tratando das regiões cortical e medular, já foi observado que cães assintomáticos apresentam hipertrofia e hiperplasia dessas regiões, enquanto ocorre atrofia em cães sintomáticos. Além disso parece que ocorre um esgotamento dos folículos linfoides e a substituição de linfócitos por macrófagos em zona cortical (GIUNCHETTI *et al.*, 2007).

Na região medular é descrito deposição de pigmentos de hemossiderina no interior de macrófagos dos seios e cordões (LIMA *et al.*, 2004). As alterações mais frequentemente descritas são um aumento da celularidade em cordões medulares e seios medulares, por um infiltrado linfohistioplasmocitário, tanto em cães assintomáticos quanto em sintomáticos (KONDO *et al.*, 2009).

A carga parasitária em linfonodos, caracterizada pela presença de formas amastigotas são encontradas em grande quantidade tanto em macrófagos da região no seio subcapsular e seios medulares, e raramente visto na região cortical (LIMA *et al.*, 2004). Em outro estudo, foi encontrada uma ampla variação entre cães infectados, na contagem de amastigotas detectadas pela técnica de imuno-histoquímica. A presença de plasmocitose e histiocitose foram significativamente associadas a alta carga parasitária (VASCONCELOS *et al.*, 2016).

Outros achados histopatológicos descritos são granulomas, além de perda de morfologia das regiões corticais e medulares, além de hiperplasia folicular (MOREIRA *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2004).

#### 2.4.3 Resposta imunológica no linfonodo

A resposta imunológica a *Leishmania* é iniciada no local de entrada do parasito através de macrófagos, onde as formas promastigotas são interiorizadas por um processo chamado de fagocitose, formando um fagossomo que se une com lisossomos para formar um fagolisossomo (Rittig e Bogdan, 2000). Esse processo é realizado por um grupo de "fagócitos profissionais" e tem como alvo micro-organismos, que são englobados em um compartimento celular no qual os mesmos podem ser mortos (Handman e Bullen, 2002).

Frente a infecção, as células B *naive* do linfonodo, penetram no sangue através das vênulas endoteliais, migrando pela área das células T e passam cerca de 24 horas antes de sair pela linfa eferente, retornando para circulação (GOODNOW, 1997). Ao encontrar o antígeno, as células B expressam moléculas antígeno específicas, aumentando a expressão do receptor de quimiocina CCR7 e migram para a fronteira entre o folículo e a área de células T, onde apresentam peptídeos derivados de antígeno no contexto de moléculas de MHC II para células auxiliares CD4 T específicas (GARSIDE *et al.*, 1998, OKADA *et al.*, 2005, REIF *et al.*, 2002).

As células B antígeno específicas então recebem sinais das células T helper, proliferam e sofrem troca de isotipos (JACOB *et al.*, MACLENNAN *et al.*, 1997, PAPE *et al.*, 2003). Algumas das progênes ativadas tornam-se plasmócitos secretores de anticorpos extrafoliculares, enquanto outras entram nos centros germinativos, onde passam por mutações somáticas para gerar células B de memória de alta afinidade e plasmócitos de vida longa (KELSOE, 1996, VINUESA *et al.*, 2005).

Outro tipo celular importante na assistência ao controle da infecção por *Leishmania* são as células dendríticas (DCs) e o comprometimento dessas células pelo parasita frequentemente resulta no aparecimento da doença, uma vez que estas células são especializadas no reconhecimento, apreensão, transporte e processamento de antígenos (FREITAS *et al.*, 2010). Entretanto, informações limitadas estão disponíveis em relação às células dendríticas na infecção canina por *L. infantum*. Silva e colaboradores (2012) relataram que o comprometimento de células dendríticas foliculares, a migração de células B, a expressão de CXCL13 e a formação de centros germinativos foram associados a formas clínicas graves da infecção por *Leishmania*.

DCs residentes no linfonodo interagem fisicamente com os condutos para adquirir o antígeno solúvel (BAJENOFF *et al.*, 2003, SIXT *et al.*, 2005), e DCs no tecido subcutâneo captam o antígeno, migram para o seio subcapsular, espalham-se entre as células do assoalho do seio para alcançar a área da célula T onde ocorre a apresentação do antígeno às células T (Cavanagh e Von Andrian, 2002, Itano e Jenkins, 2003).

Apesar dos grandes avanços nos estudos sobre a imunopatogênese na LVC, o entendimento sobre o comportamento destas células em tecido linfoide secundário bem como a importâncias destes sítios no curso grave da doença ainda não está completamente elucidado.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Caracterizar as alterações morfológicas e a resposta imune tecidual dos linfonodos associadas às formas graves da leishmaniose visceral canina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações histopatológicas em linfonodos de cães com infecção ativa e infecção não ativa por *Leishmania infantum*;
- Associar as alterações histopatológicas em linfonodos com o tipo de desorganização da polpa branca esplênica causada pela infecção por *Leishmania infantum*;
- Analisar morfometricamente os linfonodos nos grupos de infecção ativa e infecção não ativa por *Leishmania infantum*;
- Caracterizar o fenótipo e distribuição estrutural dos principais constituintes celulares no parênquima dos linfonodos desses animais.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 SELEÇÃO DE CÃES E SUBGRUPOS COM BASE NA MORFOLOGIA ESPLÊNICA

Este é um estudo retrospectivo baseado em espécimes histológicos e registros experimentais arquivados no Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LaPEM), no Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ (Bahia, Brasil). Foram selecionados 33 casos de cães sem raça definida, naturalmente infectados provenientes de Jequié (Bahia, Brasil, uma área endêmica para LV) coletados no período de 2004 a 2010, em colaboração com o Programa de Vigilância de Doenças Endêmicas do Serviço de Saúde do Estado da Bahia.

Neste período todos os animais foram examinados clinicamente por pelo menos dois médicos veterinários pertencentes ao LaPEM, utilizando fichas clínicas padronizadas. Foram identificados o sexo, idade, porte e sinais clínicos como:

- Emagrecimento: magros, animais com costelas e pelve evidente; caquéticos, animais com costelas e pelve aparentes e atrofia muscular na região temporal e escapular.
- Esplenomegalia: animais com baço palpável além da última costela.
- Linfadenomegalia: aumento do tamanho dos linfonodos, considerando: em cães com peso inferior a 5 kg, linfonodos maiores do que 2 cm (eixo maior); cães com 5-10 kg e com linfonodo maior do que 3,5 cm, e cães com mais de 10 kg e com linfonodo maior que 4 cm.
- Onicogribose: aumento (> 1 cm) das unhas em todos os membros.
- Alopecia: regiões sem pelos em diferentes áreas da pele.
- Conjuntivite: Inflamação da conjuntiva representada por vermelhidão ou secreção purulenta.
- Anemia: membranas mucosas pálidas (rosa claro) nos olhos e boca.
- Desidratação: redução do turgor cutâneo, visualizado através da redução da elasticidade da pele.

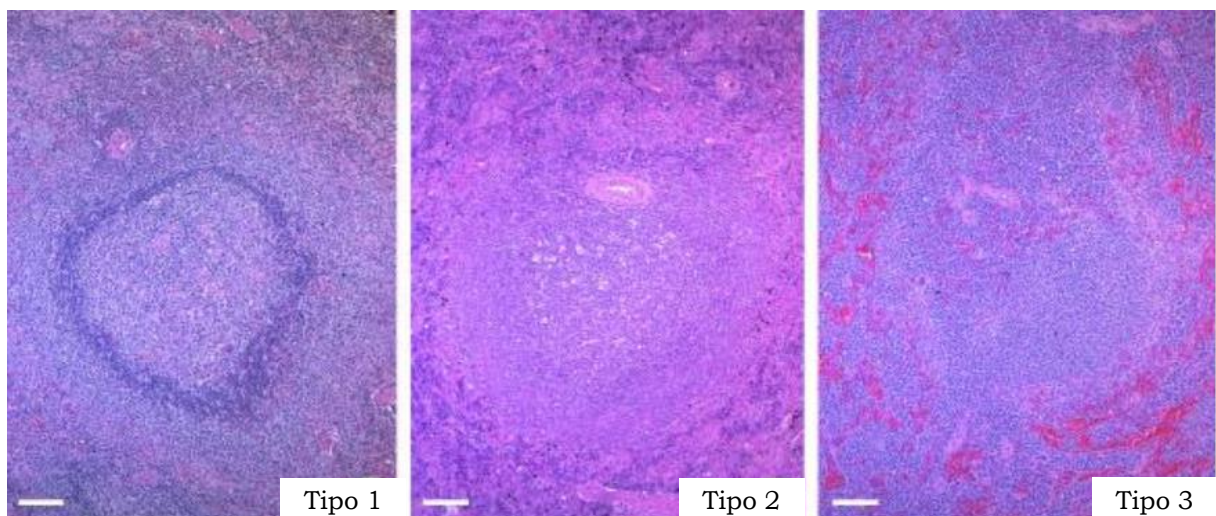
A partir de 2010, foram coletados alguns exames laboratoriais para o nosso estudo como: hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem global e diferencial de células vermelhas e leucócitos, dosagem de proteínas séricas totais e frações,

ureia, creatinina, TGO, TGP, colesterol, HDL. Estes dados encontram-se na seção de anexos desta dissertação.

Os animais foram eutanasiados, necropsiados e fragmentos de baço e de linfonodos poplíteos foram colhidos, armazenados em formol a 10%. Estes animais foram divididos nos seguintes grupos: Infecção ativa, aqueles apresentaram teste ELISA positivo para *Leishmania infantum* com cultura esplênica também positiva; e Infecção inativa, com teste ELISA negativo e com cultura esplênica negativa. Os animais também foram confirmados positivos quanto a infecção por *Leishmania* através da técnica qPCR.

A partir disto, os animais foram divididos em dois subgrupos com base na observação da arquitetura esplênica segundo o critério de Santana e colaboradores (2008): *bem organizado*, quando se distingue a bainha periarteriolar de linfócitos, centro germinativo, zona do manto e a zona marginal (baço Tipo 1); *moderadamente desorganizado*, quando apresenta mudanças hipoplásicas e hiperplásicas levando a uma perda da definição de algumas regiões da polpa branca (baço Tipo 2); e *extensivamente desorganizado*, quando a estrutura folicular está raramente distinta da polpa vermelha e áreas da célula T (baço Tipo 3). A Figura 2, mostra aspectos histológicos representativos dessas categorias de organização do tecido esplênico (Santana et al, 2008). Apenas animais de baços TIPO 1 e TIPO 3 foram incluídos nesse estudo, por serem considerados grupo polares.

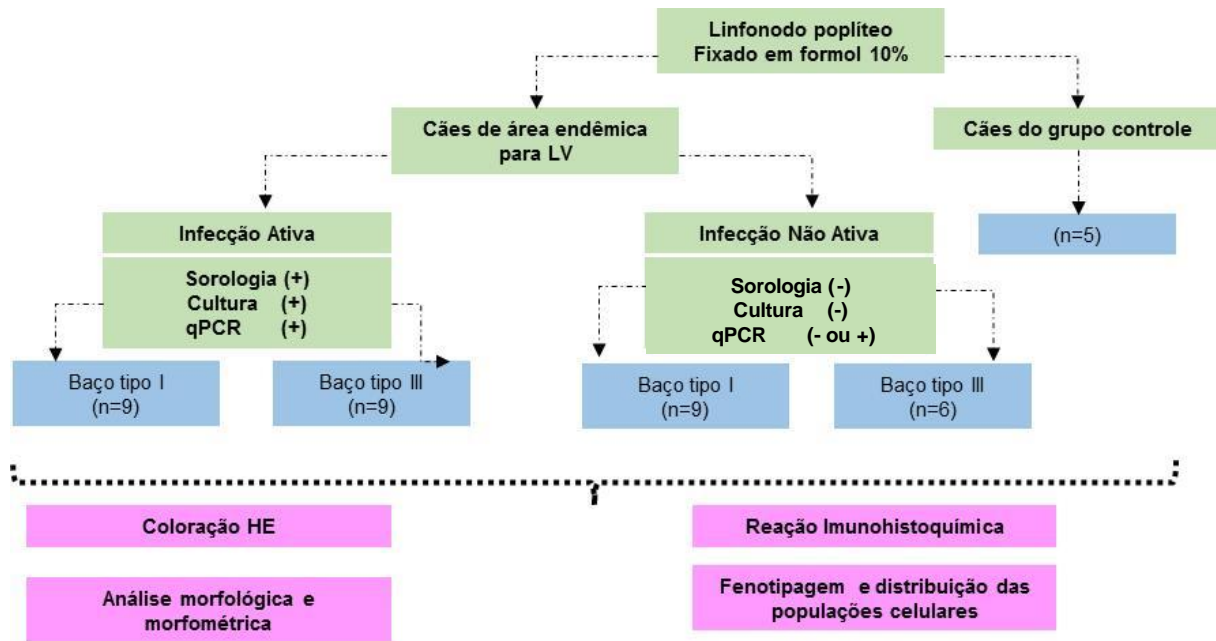
Foram colhidos cinco linfonodos poplíteos caninos, cedidos pelo setor de Patologia Veterinária do Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros



**Figura 2.** Fotografias representativas de polpa branca esplênica organizada, baço TIPO1, levemente desorganizada, baço TIPO2 e extensivamente desorganizada, baço TIPO3 (200X). Fonte: SANTANA et al., 2008

Neto (HOSPMEV UFBA) para compor um grupo controle. Os animais utilizados como grupo controle apresentaram como *causa mortis* politraumatismo ou intoxicação por carbamato, comprovados a partir da análise microscópica e toxicológica.

A Figura 3 mostra o delineamento experimental e o número de animais que compõe cada grupo.



**Figura 3.** Desenho experimental

## 4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Secções de linfonodos poplíteos foram fixadas em formol a 10%, desidratadas com álcool, clarificadas em xilol e incluídas na parafina. As secções histológicas foram cortadas com espessura de 4,0  $\mu\text{m}$  e coradas pela hematoxilina-eosina (H&E), para análise em microscopia óptica convencional.

As alterações microscópicas presentes nos linfonodos foram avaliadas de forma cega. Foi considerando a presença ou ausência de infiltrado (plasmócito, neutrófilo e macrófagos) e a reação celular predominante nos diferentes compartimentos dos linfonodos (cápsula, seios e cordões medulares). A intensidade dos achados foi graduada como ausente (0), discreta (1), moderada (2) e intensa (3) para a caracterização dos infiltrados. A distribuição foi classificada como focal (1), multifocal (2) e difusa (3). Foi avaliado também a presença de:

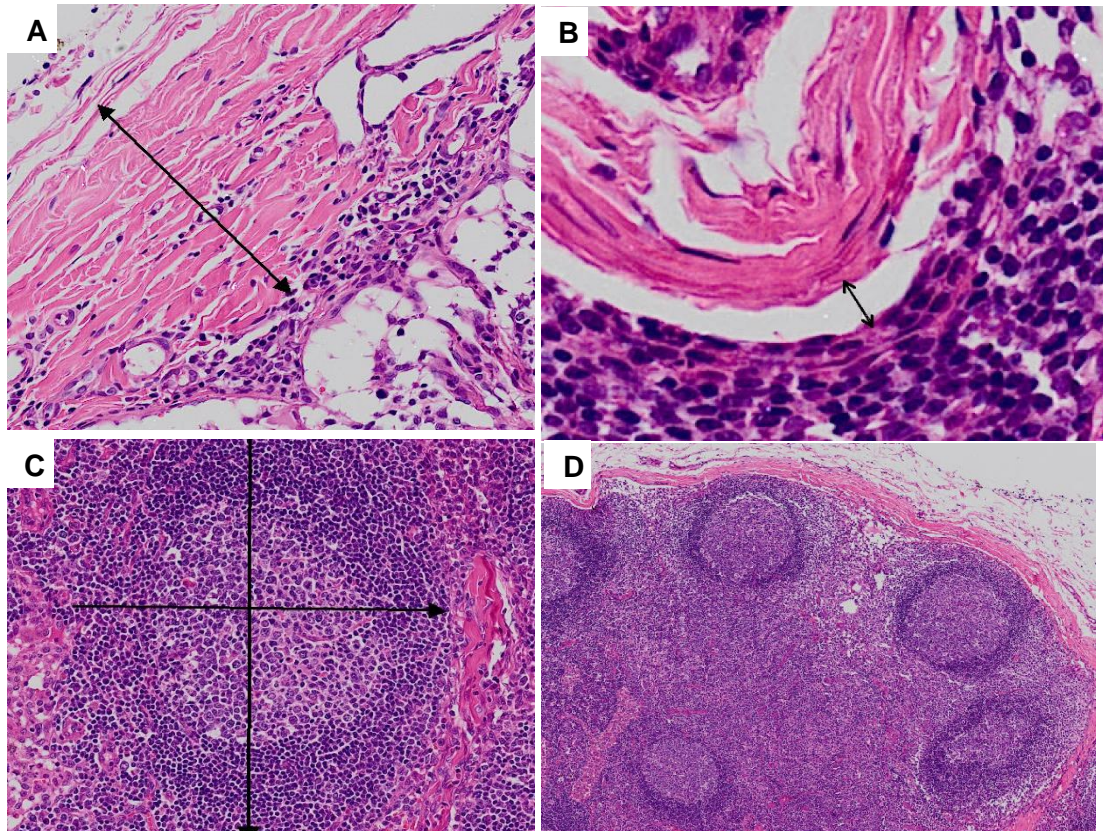
granulomas, hemossiderina, histiocitose, plasmocitose e presença de formas amastigotas.

#### 4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA ESTRUTURAL DOS LINFONODOS

Imagens das seções dos linfonodos corados com H&E foram digitalizadas por um digitalizador de cortes histológicos (Olympus, Japão) e para análise morfológica utilizando-se o programa Imagem Pro Plus versão 6.0 (Media Cybernetics, Estados Unidos). Foram avaliados os seguintes componentes:

1. Foram selecionadas três imagens aleatórias e não sobrepostas da cápsula e seio de cada caso, sendo calculado a média: a cápsula foi mensurada traçando-se uma linha desde a face externa do linfonodo até o limite entre a cápsula e o seio subcapsular (Fig.4A); O seio subcapsular foi mensurado, traçando-se uma linha entre o limite interno da cápsula e o limite externo da região cortical; (Fig 4B);
2. O folículo linfóide secundário foi mensurado através da média dos diâmetros principais de cinco folículos linfóides por amostra, além de sua área total e seu centro germinativo. (Fig 4C);
3. Foram contabilizados todos os folículos linfóides primários e secundários em todos os cortes histológicos (Fig 4D).





**Figura 4.** Corte longitudinal do linfonodo de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum*. **(A)** Corte da região cortical mostrando os pontos usados para medir a cápsula (seta preta) Hematoxilina-eosina, obj 20x. **(B)** Corte da região cortical mostrando os pontos para medir o seio capsular (seta preta) Hematoxilina-eosina, obj 20x. **(C)** Imagem do folículo linfoide mostrando metodologia usada para medir o tamanho. Hematoxilina-eosina, obj 20x. **(D)** Imagem com folículos linfoides secundários a serem contabilizados.

#### 4.4.1 Plasmócitos

Secções de linfonodos foram submetidas a processamento imuno-histoquímico, já descrito por Silva-O'hare e colaboradores (2016), utilizando os anticorpos anti-plasmócitos (anti-IgA e anti-IgG). Para a identificação de plasmócitos, as secções de linfonodos foram fixadas em formalina ácida, incluídas em parafina e cortadas em lâminas previamente tratadas com Poly-L-Lisine. Em seguida as secções foram desparafinizadas em xileno, reidratados em acetona e alcoóis graduados, em seguida foi realizada uma remoção de pigmento de formol com a solução de hidróxido de amônio (10%) em álcool 70% por 15 minutos, lavagem com água destilada e mergulho de 5 minutos em tampão PBS + Tween 20 a 0,1%. Posteriormente, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (0,5%) em metanol + PBS por 30 minutos. As lâminas foram lavadas por três vezes de dois minutos com PBS e foi feita a exposição de sítios antigênicos enzimática com 0,1% de solução cálcio/tripsina por 30 minutos. Após mais lavagens, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com soro de coelho a 5% diluído em PBS para o bloqueio das reações inespecíficas. Em seguida, as lâminas foram incubadas em overnight (16 horas) em câmara úmida com os anticorpos primários anti-IgG e anti-IgA (Nordic Immunological Laboratories) diluídos em PBS. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos com anticorpo secundário conjugado a peroxidase feito em coelho (Sigma Aldrich A5420), diluído a 1/200 em PBS. Em seguida, foi feita a revelação com solução de DAB por 5 minutos.

As lâminas foram novamente lavadas com água destilada e mergulhadas em PBS + Tween 20 à 0,1% por dois minutos, mergulhadas na hematoxilina por um minuto, desidratadas com lavagens de água, álcool, acetona, xileno e montadas com lamínulas e Entellan. Os detalhes de titulação, clone e fabricante dos anticorpos que foram utilizados e definidos previamente, estão sumarizados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Anticorpos específicos para marcação de plasmócitos secretores de diferentes isotipos de imunoglobulinas que foram utilizados na fenotipagem.

Anticorpo	Marca	Diluição	Clone
Goat anti- Dog IgA	NordicLab	1/400	Policlonal
Goat anti- Dog IgG	NordicLab	1/400	Policlonal

#### 4.4.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS, MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS B

Secções de linfonodos fixadas em formalina e incluídas em parafina foram submetidas ao processamento imuno-histoquímico utilizando os anticorpos, anti-S100 (células dendríticas foliculares), CD68 (macrófagos) e CD79 $\alpha$  (linfócito B).

Para isso, secções dos linfonodos com espessura de 4,0  $\mu$ m foram montadas em lâminas previamente tratadas em solução de Poly-L-Lysine (Sigma -Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). As secções foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Posteriormente, foi feita a recuperação de sítios antigênicos com exposição das lâminas a tampão citrato na concentração de 0.1 mM e pH = 6.0 (para reação com o anticorpo anti-S100) ou tris-EDTA pH = 9.0 (para reações com anticorpos C68 e anti- CD79 $\alpha$ ) em vapor.

Após novas lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com PBS + BSA 0,1% (T.A.) por trinta minutos para o bloqueio de ligações inespecíficas. Posteriormente, foi feita a incubação com HRP *Polymer Detector* (Cell Marque 954D-32) e ao final de 10 minutos, as lâminas foram lavadas e incubadas *Amplifier for Mouse and Rabbit* (Cell Marque 954D31) por mais 10 minutos e lavadas em seguida com PBS. Foi feita a revelação com *DAB solution* (T.A.). Após a revelação, as lâminas foram lavadas sucessivas vezes com água corrente e destilada, contra coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas com lamínulas com Entellan. Os detalhes de titulação, clone e fabricantes dos anticorpos foram definidos previamente e estão sumarizados na tabela 2.

**Tabela 2.** Lista de anticorpos para fenotipagem celular

Anticorpo	Marca	Diluição	Código
Cd68	Abcam	1/100	125212
S100	Dako	1/100	Z0311
Cd79 $\alpha$	Dako	1/100	JCB117

#### 4.4.3 Contagem de células

Imagens de secções de linfonodos poplíteos corados com os diferentes anticorpos foram digitalizados pelo digitalizador de cortes histológicos (Olympus-Japão) e o programa Imagem Pro Plus versão 6.0 0 (Media Cybernetics, Rockville,

MD, Estados Unidos) foi usado para contagens de células em três regiões: cortical, paracortical e medular.

A contagem de células segue a padronização proposta por Silva O'hare e colaboradores (2016). Foram selecionadas três imagens aleatórias e não sobrepostas de cada região do linfonodo (zona cortical, paracortical e medular), sendo que todas as imagens digitalizadas possuíam a mesma área, não ocorrendo variação da mesma. A média das contagens obtidas em cada região do linfonodo, foi usada para estimativas da densidade de populações de células em cada compartimento (densidade de população de células = número de células / área definida).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados em tabelas e gráficos com números absolutos ou proporções. A significância estatística das diferenças observadas entre três diferentes grupos foi determinada usando testes paramétricos de comparação de médias (ANOVA) para variáveis de distribuição normal, ou Kruskal Wallis quando os dados foram não paramétricos. Para comparação de dois grupos, foi utilizado o Mann Whitney para variáveis sem distribuição normal, para variáveis semi quantitativas o Teste T para dados paramétricos.

Diferenças entre proporções foram analisadas utilizando teste exato de Fisher ou Qui-quadrado, quando recomendado. O valor crítico para significância dos resultados foi estabelecido para  $P < 0,05$ .

Os dados foram analisados utilizando-se o Prisma 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS CÃES INCLUSOS NA ANÁLISE

As principais características dos 33 cães com leishmaniose visceral incluídos neste estudo estão apresentadas na Tabela 3.

Dentre os animais estudados, 57% (19/33) eram machos, 36% (12/33) adultos com idade de 3-5 anos, 51% (17/33) eram do porte médio. Entre os 33 cães, 54% (18/33) foram positivos no ELISA e 46% (15/33) negativos. O cultivo *in vitro* da *Leishmania* a partir da punção esplênica foi positivo em 54%(18/33) dos cães e negativo em 46% (15/33). Com base nestes resultados foi possível dividir os cães nos grupos de infecção ativa (INF+) e não ativa (INF-).

Sinais clínicos associados a leishmaniose visceral canina estavam presentes: 44% (8/18) dos cães com infecção ativa apresentaram aspecto corporal magro e 22 % (4/18) eram caquéticos. Além disso 62% (10/18) destes cães apresentaram linfadenomegalia e 50% (9/18) apresentaram esplenomegalia. Neste último parâmetro, houve diferença estatística significativa com cães de infecção não ativa ( $p=0,032$ , Teste exato de Fischer).

Dentre os cães com infecção ativa, 22% (4/18) apresentaram onicogrifose, 67% (12/18) alopecia, 44% (8/18) conjuntivite, 50% (9/18) alterações em mucosas e 33% (6/18) estavam desidratados. Não houve diferença estatística entre os dois grupos nestes parâmetros.

**Tabela 3.** Características gerais dos cães com leishmaniose visceral incluídos no estudo

<b>Parâmetros</b>	<b>Infecção ativa</b>	<b>Infecção não ativa</b>
	<b>n= 18 (%)</b>	<b>n= 15 (%)</b>
<b>Idade</b>		
0-2 anos	6 (33%)	5 (33%)
3-5 anos	4 (22%)	8 (53%)
>6 anos	2 (12%)	1 (7%)
Sem informação	6 (33%)	1 (7%)
<b>Porte</b>		
Pequeno	8 (44%)	3 (20%)
Médio	9 (50%)	8 (53%)
Grande	1 (6%)	4 (27%)
<b>Sexo</b>		
Macho	11(73%)	8 (53%)
Fêmea	7 (27%)	7 (47%)
<b>ELISA</b>		
Positivo	18 (100%)	0
Negativo	0	15 (100%)
<b>Cultura esplênica</b>		
Positiva	18 (100%)	0
Negativa	0	15 (100%)
<b>Aspecto</b>		
Normal	4 (22%)	9 (60%)
Magro	8 (44%)	6 (40%)
Caquético	4(22%)	0
Obeso	2(12%)	0
<b>Linfonodo</b>		
Normal	8 (44%)	8 (53%)
Aumentado	8(44%)	7 (27%)
Generalizado	2(11%)	0

<b>Parâmetros</b>	<b>Infecção Ativa</b> n= 18 (%)	<b>Infecção Não Ativa</b> n= 15 (%)
<b>Esplenomegalia <sup>a</sup></b>		
Presente	9 (50%)	2 (14%)
Ausente	9 (50%)	13 (86%)
<b>Onicogrifose</b>		
Presente	4 (22%)	2 (13%)
Ausente	14 (78%)	13 (87%)
<b>Alopecia</b>		
Presente	12 (67%)	6 (40%)
Ausente	6 (33%)	9 (60%)
<b>Conjuntivite</b>		
Presente	8 (44%)	5 (33%)
Ausente	6 (33%)	4 (27%)
Não relatada	4 (22%)	6 (40%)
<b>Mucosas</b>		
Normocoradas	4 (23%)	6 (40%)
Anêmicas	3 (16%)	0
Hipocoradas	5 (27%)	3 (20%)
Congesta	1 (7%)	0
Sem informação	5 (27%)	6 (40%)
<b>Desidratação</b>		
Normal	4 (23%)	6 (40%)
Desidratado	6 (33%)	2 (13%)
Não relatado	8 (44%)	7 (47%)

<sup>a</sup>: Diferença entre os dois grupos  $p=0,032$

## 5.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DESCRITIVA DOS LINFONODOS

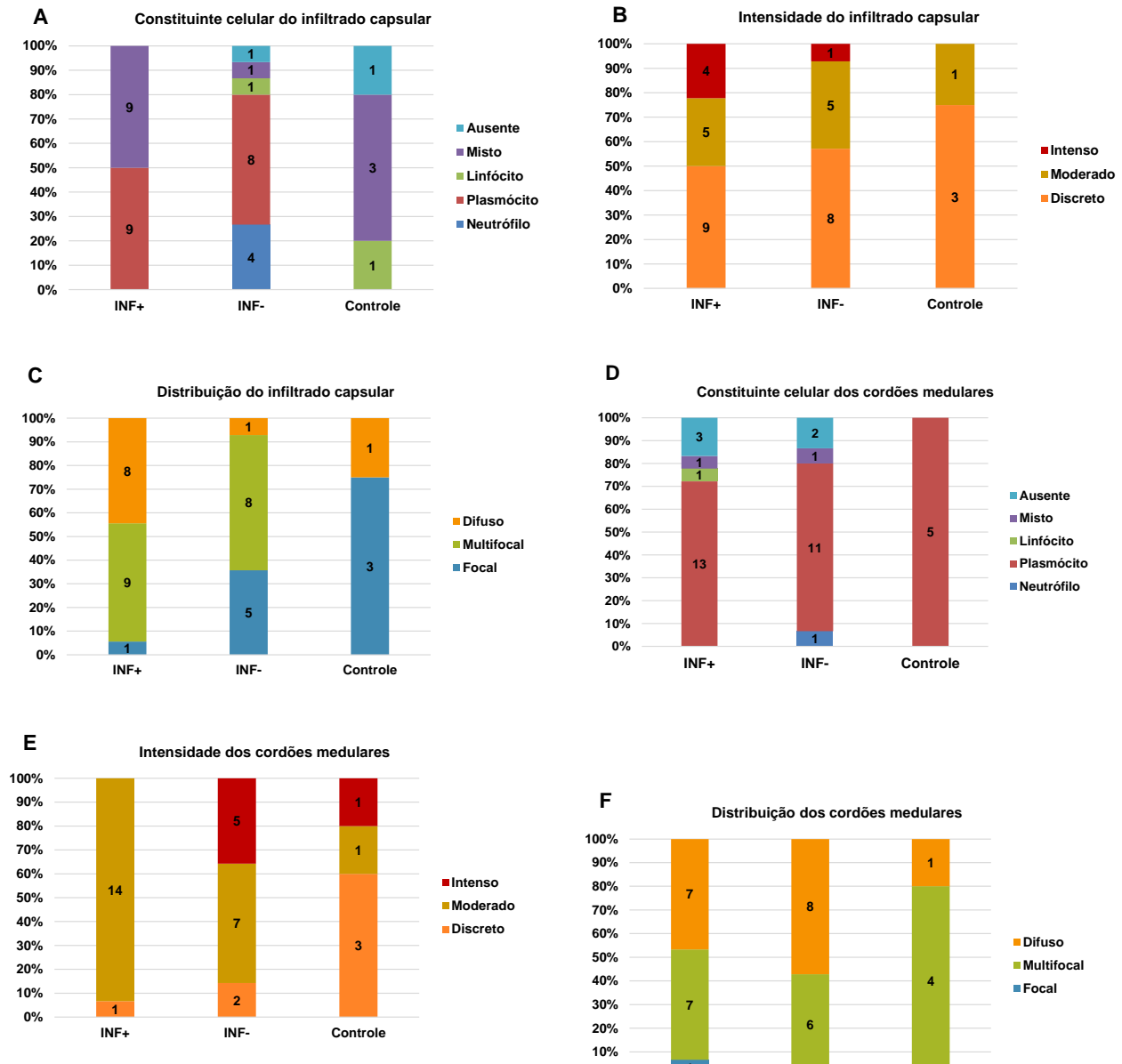
As alterações histopatológicas observadas na cápsula e nos cordões medulares em linfonodos dos cães com infecção ativa, não ativa por *Leishmania infantum* e do grupo controle estão resumidas nos gráficos da Figura 5.

A presença do infiltrado em cápsula foi uma alteração frequente, tanto em cães com infecção ativa (100%) como infecção não ativa (93%), apresentando em sua grande maioria um infiltrado inflamatório plasmocitário peri e intracapsular, observados em 50% (9/18) dos linfonodos de cães com infecção ativa, os outros 50% (9/18) apresentaram um infiltrado inflamatório misto (mais de um tipo celular predominante). Em 53% (8/15) dos cães com infecção não ativa, foi observado infiltrado inflamatório constituído de plasmócitos e em 26% (4/15) neutrófilos estavam presentes em seus linfonodos. No grupo controle, o infiltrado capsular esteve presente em 80% (4/5) dos cães, sendo que 60% (3/4) apresentaram um infiltrado misto (linfoplasmocitário) e em 20% (1/4) apresentaram um infiltrado linfocítico.

Com relação a intensidade do infiltrado capsular e distribuição do infiltrado capsular, os três grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

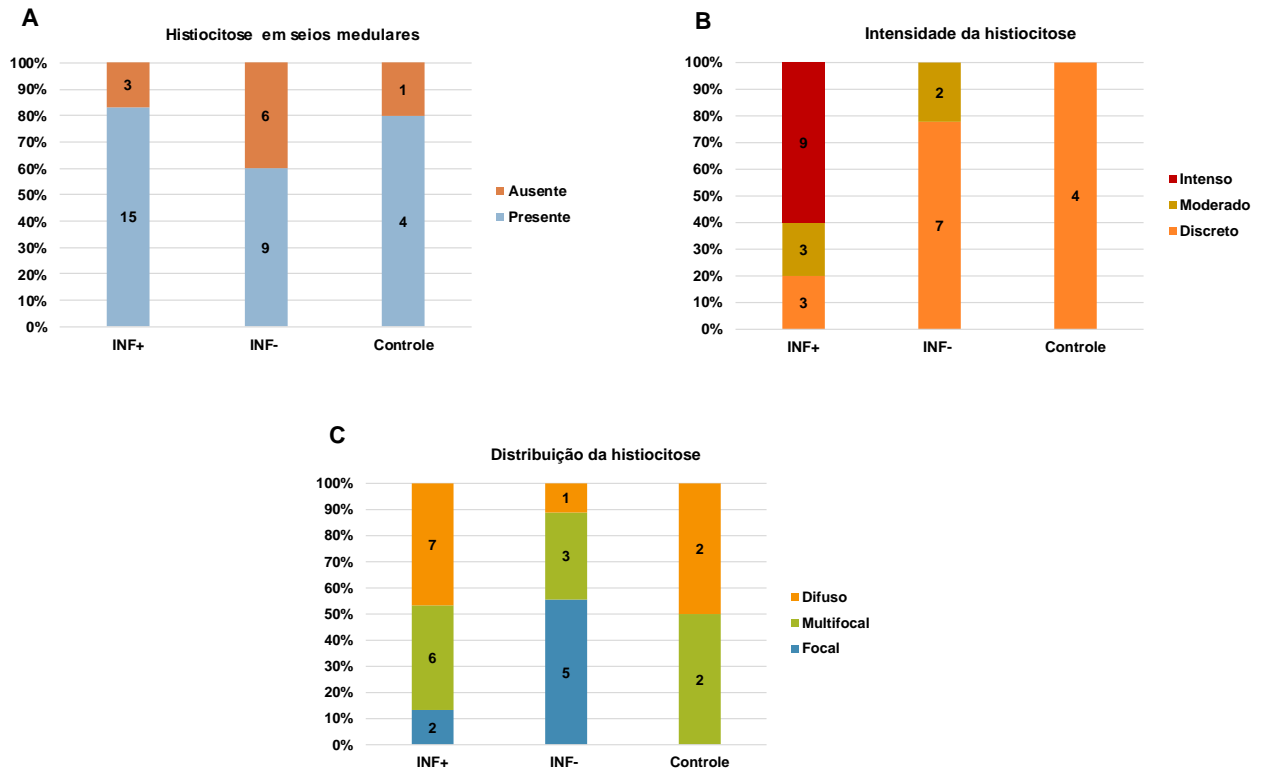
Infiltrado em cordões medulares foi observado em 83% (15/18) dos linfonodos de cães com infecção ativa, 87 % (13/15) não ativa e 100% (5/5) do grupo controle.





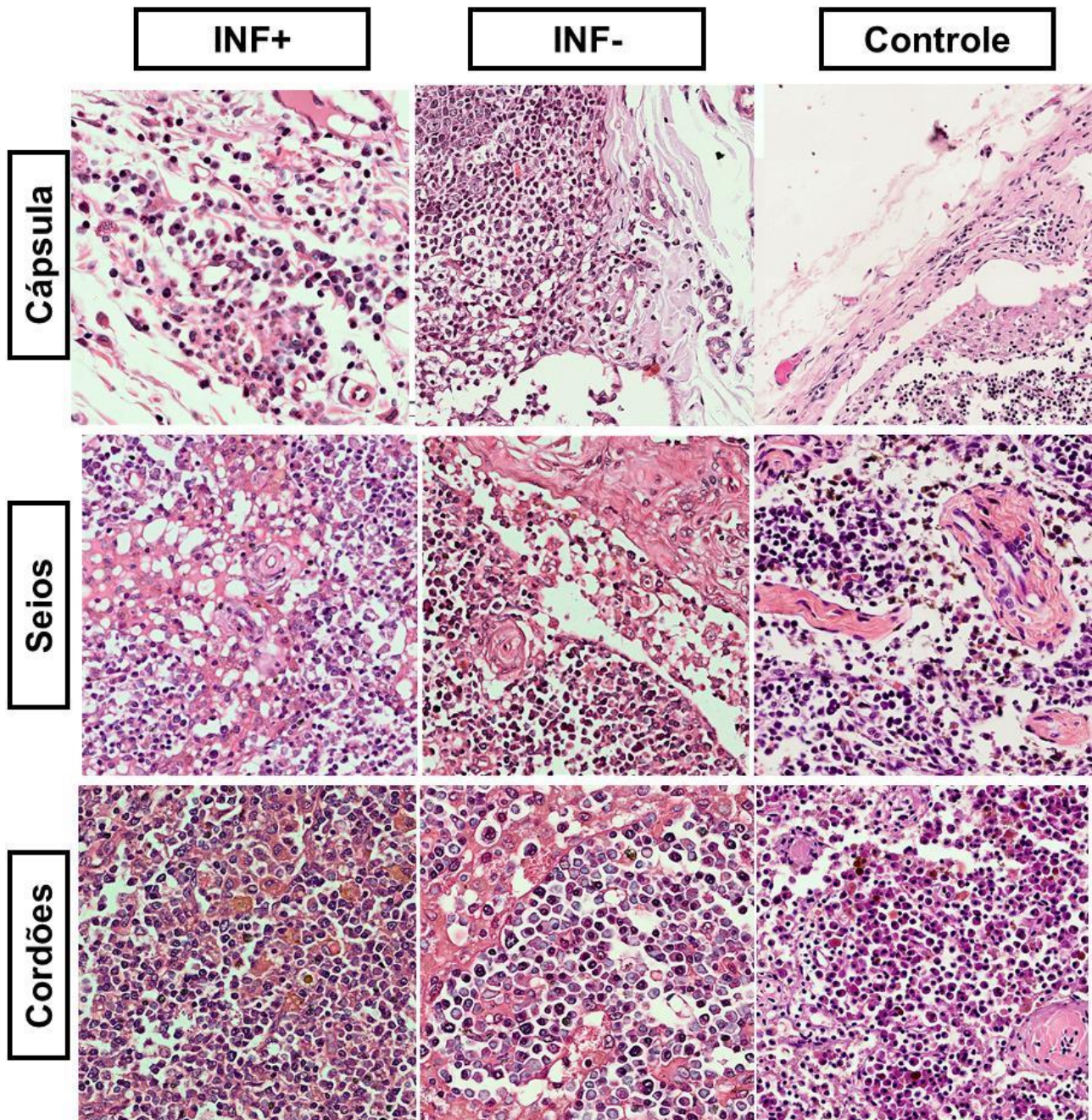
**Figura 5.** Frequência das alterações histopatológicas em linfonodos em cães com infecção ativa e não ativa por *Leishmania infantum* e grupo controle. **(A)** Constituinte celular do infiltrado capsular; **(B)** Intensidade do infiltrado capsular; **(C)** Distribuição do infiltrado capsular; **(D)** Constituinte celular dos cordões medulares; **(E)** Intensidade dos cordões medulares; **(F)** Distribuição dos cordões medular.

A frequência de histiocitose em seios medulares foi observada em 83% (15/18) dos cães com infecção ativa, 60% (9/15) dos cães com infecção não ativa e 80% (4/5) em cães do grupo controle. Não houve diferença entre os grupos de infecção ativa e não ativa, em relação a intensidade e distribuição desta alteração.



**Figura 6.** Frequência da histiocitose em seios medulares em linfonodos de cães com infecção ativa e não ativa por *Leishmania infantum* e grupo controle. **(A)** Presença da Histiocitose; **(B)** Intensidade da histiocitose em seios medulares; **(C)** Distribuição da histiocitose em cordões medulares.

A figura 8 mostra as imagens dos tipos de infiltrado encontrados em cápsula, em cordões medulares e histiocitose em seios medulares dos linfonodos poplíteos de cães com infecção ativa e não ativa por *Leishmania infantum*, além do grupo controle.



**Figura 7.** Fotografias representativas de linfonodos de cães com infecção ativa (INF+) não ativa (INF) para *Leishmania* e do grupo controle em diferentes estruturas. Cápsula: cães com infecção ativa apresentando infiltrado misto (H&E, 400x), cães com infecção não ativa apresentando infiltrado plasmocítico e cães do grupo controle apresentando infiltrado misto; Seios presença de histiocitose em ambos os grupos (H&E 400X); Cordões com infiltrado plasmocítico em ambos os grupos (H&E, 400x)

### 5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS LINFONODOS COM A DESORGANIZAÇÃO ESPLÊNICA CAUSADA PELA INFECÇÃO DE *LEISHMANIA INFANTUM*

#### 5.3.1 *Características gerais e clínicas dos animais com infecção ativa baço TIPO 1 e TIPO 3*

A tabela 5 mostra as características gerais e clínicas dos animais com infecção ativa com baço organizado (TIPO 1) e baço desorganizado (TIPO 3).

Cães com infecção ativa com baço tipo 1 em sua maioria (45%) eram adultos jovens, de porte médio (56%) e machos (56%). Os cães com infecção ativa com baço tipo 3 eram adultos (56%), de porte médio (56%) e fêmeas (56%).

Com relação aos sinais clínicos, cães com infecção ativa baço tipo 3 em sua maioria apresentaram escore corporal magro (56%) e caquético (33%), enquanto os animais com infecção ativa e baço tipo 1, apenas 11% eram caquéticos e 44% estavam magros.

Aumento de linfonodos foi observado em 44% dos cães com infecção ativa com baço tipo 1, e em 67% dos cães com baço tipo 3. Esplenomegalia (44%) foi em ambos os grupos. Foi encontrada onicogribose (33%) e alopecia (89%) em cães com baço tipo 3 e cães com baço tipo 1, 11% e 44% respectivamente. Conjuntivite (56%) em cães com infecção ativa e baço tipo 1 enquanto nos animais com infecção ativa baço tipo 3 ela foi mais ausente (56%).

Os cães com infecção ativa e baço tipo 3 apresentaram alterações em mucosas (78%), sendo que a maioria encontrava-se mais desidratado (56%).



**Tabela 4.** Características gerais e clínicas de cães com infecção ativa por *Leishmania infantum* associada a organização da polpa branca esplênica.

<b>Parâmetros</b>	<b>Baço TIPO 1</b>	<b>Baço TIPO 3</b>
	<b>n = 9 (%)</b>	<b>n = 9 (%)</b>
<b>Idade</b>		
0-2 anos	4 (44%)	2 (22%)
3-5 anos	1 (11%)	5 (56%)
>6 anos	1 (11%)	0
Sem informação	3 (33%)	2 (22%)
<b>Porte</b>		
Pequeno	3 (33%)	4 (44%)
Médio	5 (56%)	5 (56%)
Grande	1 (11%)	0
<b>Sexo</b>		
Macho	5 (56%)	4 (44%)
Fêmea	4 (44%)	5 (56%)
<b>Aspecto</b>		
Normal	4 (44%)	1 (11%)
Magro	4 (44%)	5 (56%)
Caquético	1 (11%)	3 (33%)
Obeso	0	0
<b>Linfonodo</b>		
Normal	5 (56%)	3 (33%)
Aumentado	2 (22%)	6 (67%)
Generalizado	2 (22%)	0
<b>Esplenomegalia</b>		
Presente	5 (55%)	5 (55%)
Ausente	4 (45%)	4 (45%)
<b>Onicogrifose</b>		
Presente	1 (11%)	3 (33%)
Ausente	8 (89%)	6 (67%)

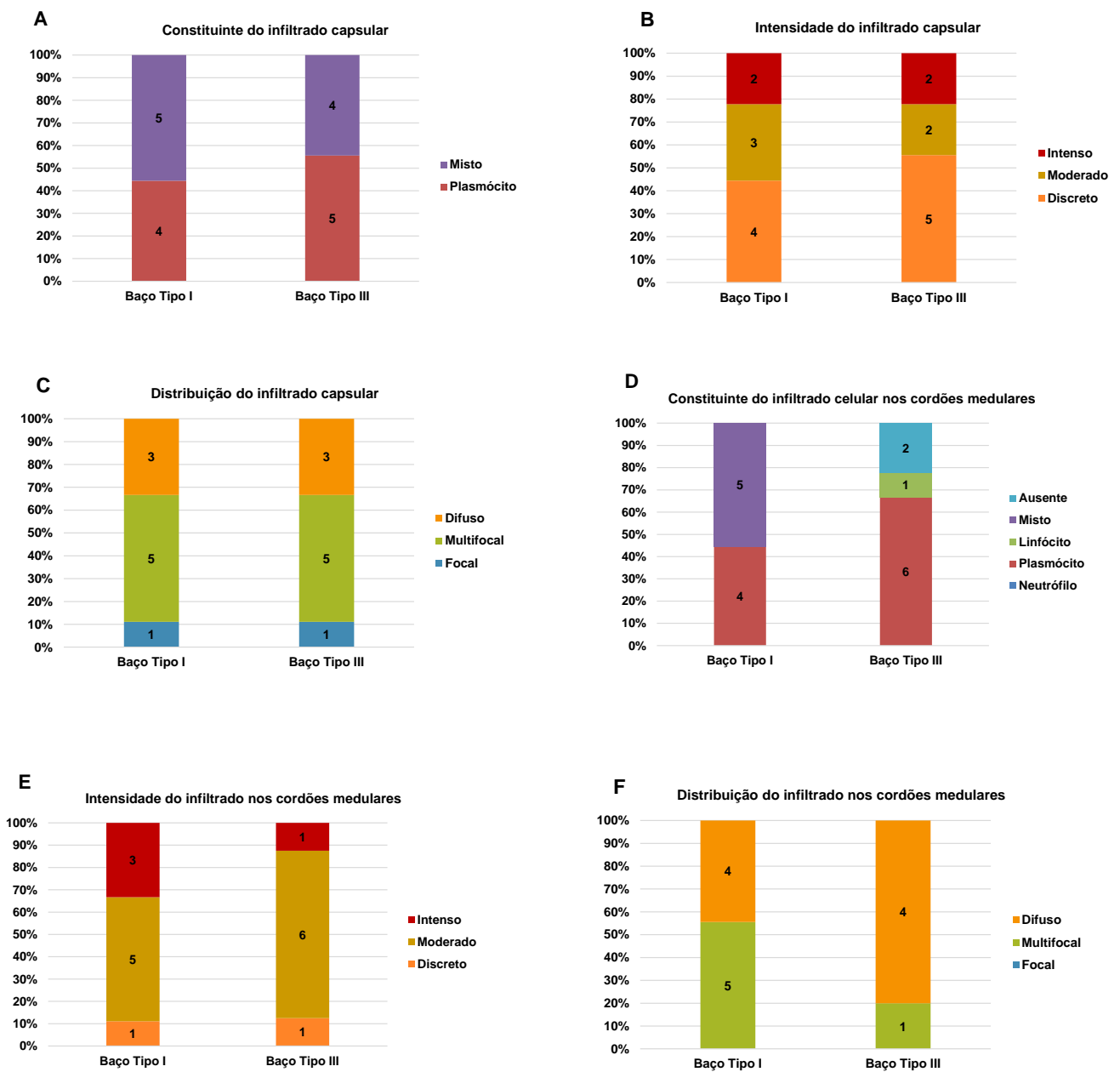
<b>Parâmetros</b>	<b>Baço TIPO 1</b>	<b>Baço TIPO 3</b>
	<b>n = 9 (%)</b>	<b>n = 9 (%)</b>
<b>Alopecia</b>		
Presente	4 (44%)	8 (89%)
Ausente	5 (56%)	1 (11%)
<b>Conjuntivite</b>		
Presente	5 (56%)	3 (33%)
Ausente	1 (11%)	5 (56%)
Não relatada	3 (33%)	1 (11%)
<b>Mucosas</b>		
Normocoradas	3 (33%)	1 (11%)
Anêmicas	1 (11%)	2 (22%)
Hipocoradas	0	5 (56%)
<b>Congesta</b>		
Sem informação	1 (11%)	0
<b>Desidratação</b>		
Normal	3 (33%)	1 (11%)
Desidratado	1 (11%)	5 (56%)
Não relatado	5 (56%)	3 (33%)

### 5.3.2 *Com infecção ativa e tipo de organização da polpa branca esplênica*

As frequências das alterações histológicas observadas em linfonodos dos cães com infecção ativa relacionadas a organização da polpa branca esplênica, estão na figura 8.

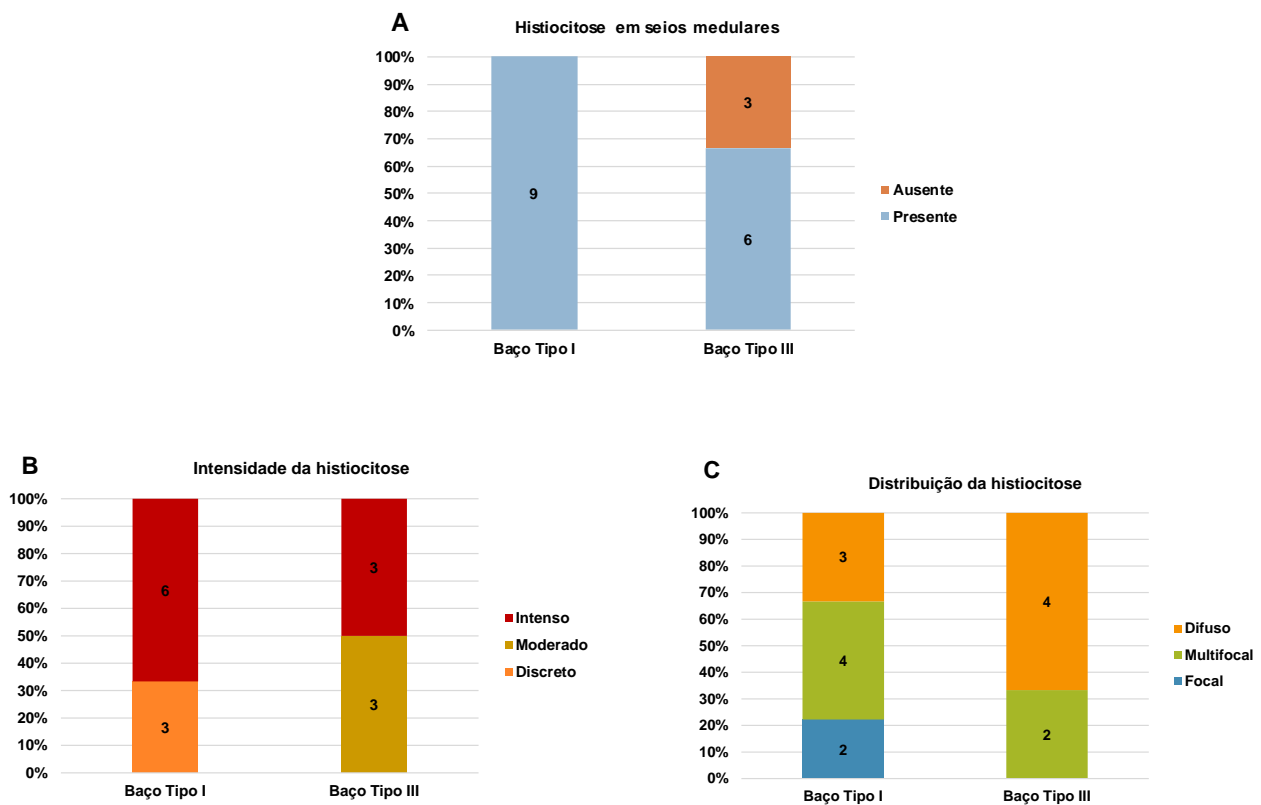
Infiltrado em cápsula foi observada em todos os linfonodos dos cães, independentemente do tipo de baço. O tipo de infiltrado mais frequente foi o infiltrado misto em 56% (5/9), seguido por infiltrado por plasmócitos em 44% (4/9) em linfonodos de cães com baço tipo 1. Cães com baço tipo 3 apresentaram uma frequência inversa: 56% com infiltrado por plasmócito (5/9) e em 44% (4/9) com infiltrado misto. Não houveram diferenças estatisticamente significativas quando ao tipo celular presente no infiltrado capsular, intensidade e distribuição do infiltrado capsular entre os grupos.

Infiltrado nos cordões medulares foi observado em 89% (8/9) dos linfonodos de cães com baço tipo 1 e 79% (7/9) nos linfonodos de cães com baço tipo 3. O tipo de infiltrado predominante nos cordões medulares em ambos os grupos foi plasmocítico em 67% (6/9) dos linfonodos. Não houveram diferenças estatisticamente significativas quando ao tipo celular presente no cordões medulares, intensidade e distribuição do infiltrado capsular entre os grupos.



**Figura 8.** Frequência das alterações histopatológicas em linfonodos em cães com infecção ativa por *Leishmania infantum* associadas a organização da polpa branca esplênica. **(A)** Constituinte celular do infiltrado capsular; **(B)** Intensidade do infiltrado capsular; **(C)** Distribuição do infiltrado capsular; **(D)** Constituinte celular dos cordões medulares; **(E)** Intensidade dos cordões medulares; **(F)** Distribuição dos cordões medular.

Nos seios medulares foi encontrado histiocitose em todos os cães com baço tipo 1 e em 67% (6/9) dos cães com baço tipo 3. A intensidade discreta predominou em 56% (5/9) nos linfonodos de cães com baço tipo 3 e foi discreta em 33% (3/9) e intensa em 67% (6/9) dos cães com linfonodo de baço tipo 1. A distribuição da histiocitose revelou-se focal em 22% (2/9) dos linfonodos de cães com baço tipo 1 e difusa na maioria dos casos com baço tipo 3 (44%; 4/9). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos parâmetros de intensidade e na distribuição da histiocitose.



**Figura 9.** Frequência da histiocitose em seios medulares em linfonodos de cães com infecção ativa por *Leishmania infantum* associada a organização da polpa branca esplênica. **(A)** Presença da Histiocitose; **(B)** Intensidade da histiocitose em seios medulares; **(C)** Distribuição da histiocitose em cordões medulares.



### 5.3.3 *Características gerais e clínicas dos animais com infecção não ativa e baço TIPO 1 e TIPO 3*

A tabela 7 mostra as características gerais e clínicas dos animais com infecção não ativa com baço organizado (TIPO 1) e baço desorganizado (TIPO 3).

Cães com infecção não ativa e baço tipo 1 em sua maioria eram adultos (67%), de porte médio (56%) e fêmeas (56%). Animais com baço tipo 3 possuíam idades variadas, sendo a maioria de porte grande (50%) e machos (83%).

Com relação a sinais clínicos, cães com baço tipo 3 em sua maioria apresentaram aspecto corpóreo magro (67%), enquanto que a maioria dos animais com baço tipo 1, apresentavam aspecto corpóreo normal (78%). 67% dos cães com infecção não ativa e com baço tipo 3 apresentaram linfonodos aumentados e enquanto 56% dos cães com infecção não ativa e com baço tipo 3 apresentaram linfonodos sem alterações. E a maioria dos animais de ambos os grupos apresentaram baços sem alterações.

Onicogribose (33%), alopecia (33%) e conjuntivite (83%) foram vistos em cães com baço tipo 3. Animais com baço tipo 1 não apresentaram esses sinais clínicos.

Os cães com baço tipo 3 apresentaram alterações nas mucosas (33%) e estavam desidratados (17%), enquanto a maioria dos cães com infecção ativa e com baço tipo 1 apresentavam mucosas normocoradas (44%) e sem sinais de desidratação (44%).

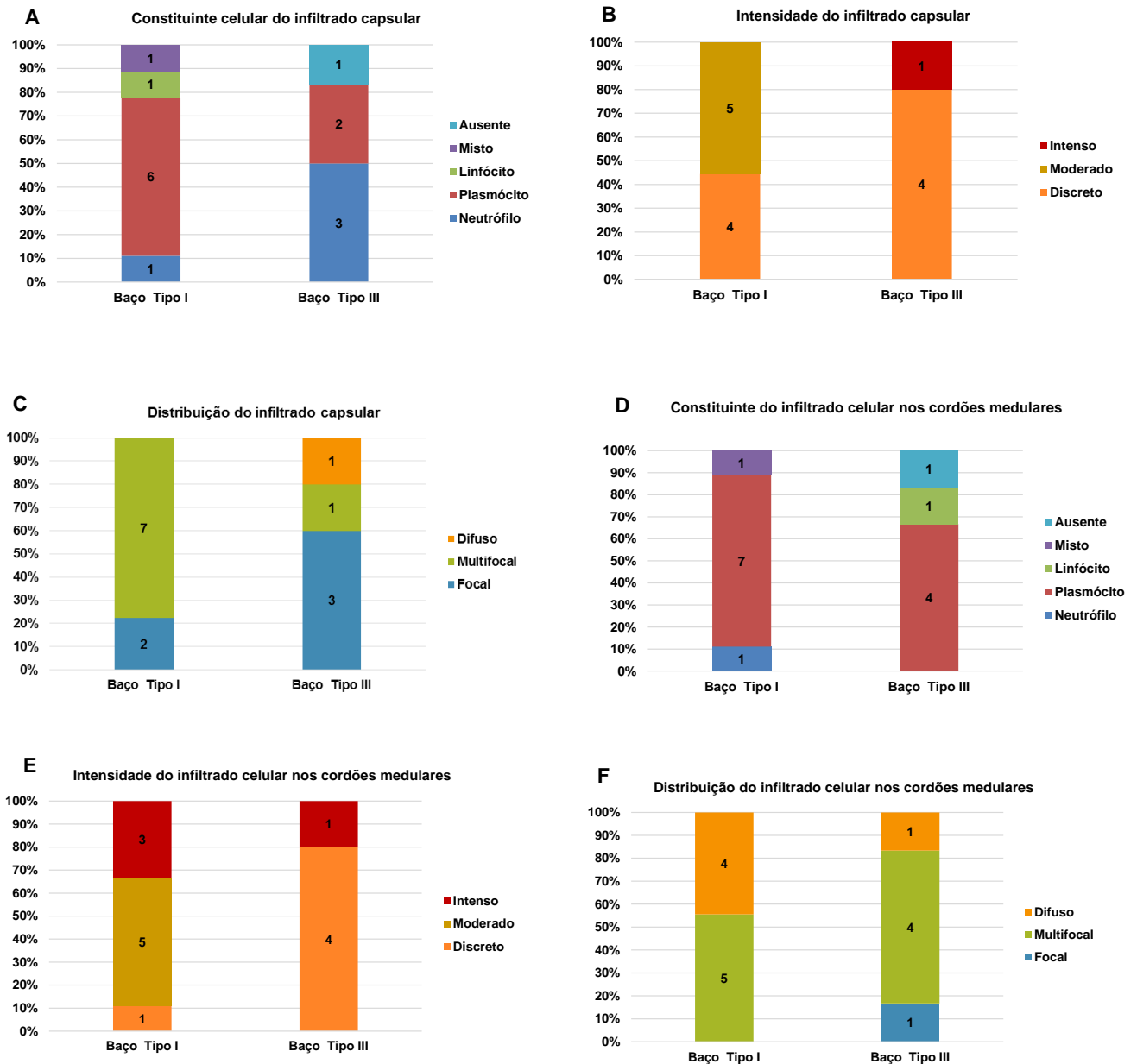
**Tabela 5.** Características gerais e clínicas de cães com infecção não ativa por *Leishmania infantum* associada a organização da polpa branca esplênica

<b>Parâmetros</b>	<b>Baço TIPO 1</b>	<b>Baço TIPO 3</b>
	<b>n = 9 (%)</b>	<b>n = 6 (%)</b>
<b>Idade</b>		
0-2 anos	3 (33%)	2 (33%)
3-5 anos	6 (67%)	2 (33%)
>6 anos	0	1 (17%)
Sem informação	0	1 (17%)
<b>Porte</b>		
Pequeno	2 (22%)	1 (17%)
Médio	6 (56%)	2 (33%)
Grande	1 (12%)	3 (50%)
<b>Sexo</b>		
Macho	4 (44%)	5 (83%)
Fêmea	5 (56%)	1 (17%)
<b>Aspecto</b>		
Normal	7 (78%)	2 (33%)
Magro	2 (22%)	4 (67%)
Caquético	0	0
Obeso	0	0
<b>Linfonodo</b>		
Normal	6 (56%)	2 (33%)
Aumentado	3 (33%)	4 (67%)
Generalizado	0	0
<b>Baço</b>		
Normal	9 (100%)	4 (67%)
Aumentado	0	2 (33%)
<b>Onicogrifose</b>		
Presente	0	2(33%)
Ausente	9 (100%)	4 (67%)

<b>Parâmetros</b>	<b>Baço TIPO 1 n = 9 (%)</b>	<b>Baço TIPO 3 n = 6 (%)</b>
<b>Alopecia</b>		
Presente	0	2 (33%)
Ausente	9 (100%)	4 (67%)
<b>Conjuntivite</b>		
Presente	0	5 (83%)
Ausente	4 (44%)	0
Não relatada	5 (56%)	1 (17%)
<b>Mucosas</b>		
Normocoradas	4 (44%)	2 (33%)
Anêmicas	0	0
Hipocoradas	1 (12%)	2 (33%)
Congesta	0	0
Sem informação	4 (44%)	2 (33%)
<b>Desidratação</b>		
Normal	4 (44%)	2 (33%)
Desidratado	1 (12%)	1 (17%)
Não relatado	4 (44%)	3 (50%)

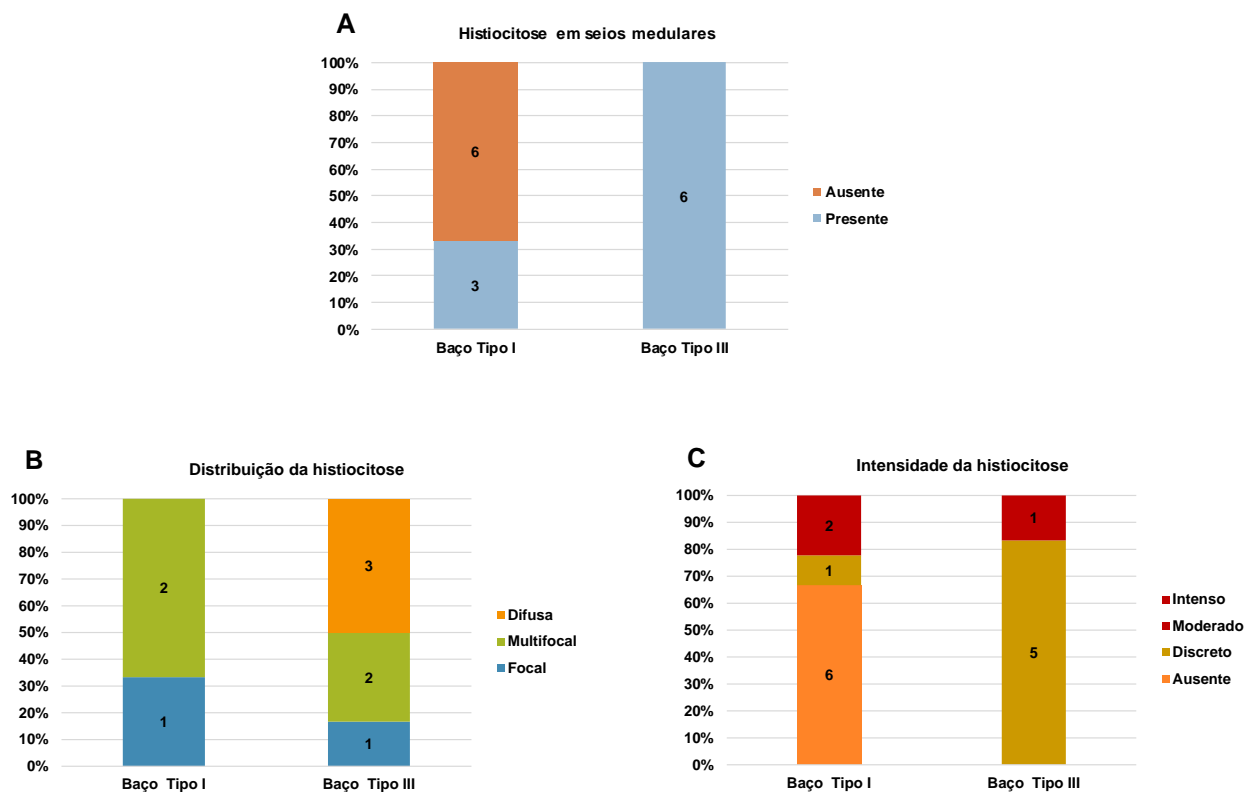
#### 5.3.4 *Com infecção não ativa e tipo de organização da polpa branca esplênica*

As alterações histológicas observadas em linfonodos dos cães com infecção não ativa relacionada a organização da polpa branca esplênica estão apresentadas na figura 10. Todos os cães com baço tipo 1 apresentaram inflamação em cápsula, e essa mesma alteração foi observada em 83 % (5/6) em linfonodos dos cães com baço tipo 3. O infiltrado plasmocítico foi mais frequente nos casos com baço tipo 1 (67%; 6/9). Nos linfonodos de cães com baço tipo 3 foi observado predomínio de infiltrado neutrofílico em 50% (3/6) destes. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao tipo presente de infiltrado.



**Figura 10.** Frequência das alterações histopatológicas em linfonodos em cães com infecção não ativa por *Leishmania infantum* associadas a organização da polpa branca esplênica. **(A)** Constituinte celular do infiltrado capsular; **(B)** Intensidade do infiltrado capsular; **(C)** Distribuição do infiltrado capsular; **(D)** Constituinte celular dos cordões medulares; **(E)** Intensidade dos cordões medulares; **(F)** Distribuição dos cordões medular.

A frequência da histiocitose, intensidade e distribuição nos seios medulares de linfonodos de cães com infecção não ativa associada a organização da polpa branca esplênica estão apresentadas na figura 11. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos parâmetros avaliados.



**Figura 11.** Frequência da histiocitose em seios medulares em linfonodos de cães com infecção não ativa por *Leishmania infantum* associada a organização da polpa branca esplênica. **(A)** Presença da Histiocitose; **(B)** Intensidade da histiocitose em seios medulares; **(C)** Distribuição da histiocitose em cordões medulares.

## 5.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS LINFONODOS DE CÃES INFECTADOS POR LEISHMANIA INFANTUM

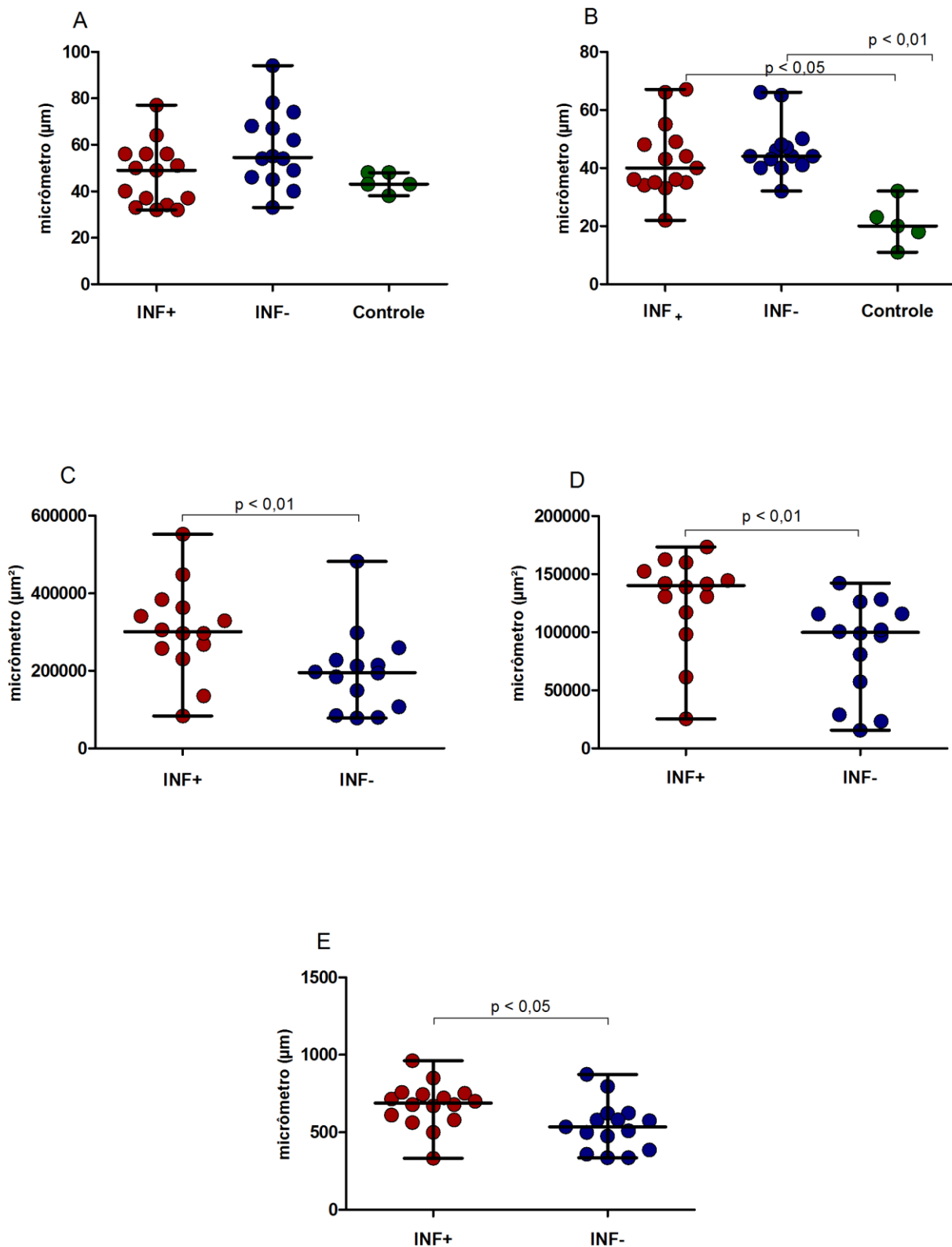
### 5.4.1 *Em relação ao tipo de infecção*

Ambos os grupos apresentaram uma espessura maior no seio subcapsular em comparação com o grupo controle (Figura 12B Teste Kruskal Wallis  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ). Não houve diferença na mensuração da cápsula nos três diferentes grupos (Figura 12A Teste Kruskal Wallis).

Cães com infecção ativa e não ativa apresentaram uma média de sete folículos primários por linfonodo poplíteo. Animais do grupo controle apresentaram uma média de cinco folículos primários por linfonodo. Não houveram diferenças significativas entre os grupos.

Cães com infecção ativa apresentaram em média doze folículos linfoides secundários no linfonodo e os cães com infecção não ativa apresentaram uma média de dezoito folículos secundários. Animais do grupo controle não apresentaram folículos linfoides secundários.

Os folículos linfoides secundários de cães com infecção ativa apresentaram áreas maiores (Figura 12C, Teste Mann Whitney,  $p = 0,0082$ ), maiores centros germinativos (Figura 12D, Teste Mann Whitney,  $p = 0,0063$ ) e maior diâmetro médio (Figura 12E, Teste Mann Whitney  $p = 0,0168$ ) em comparação com os linfonodos de cães com infecção não ativa.

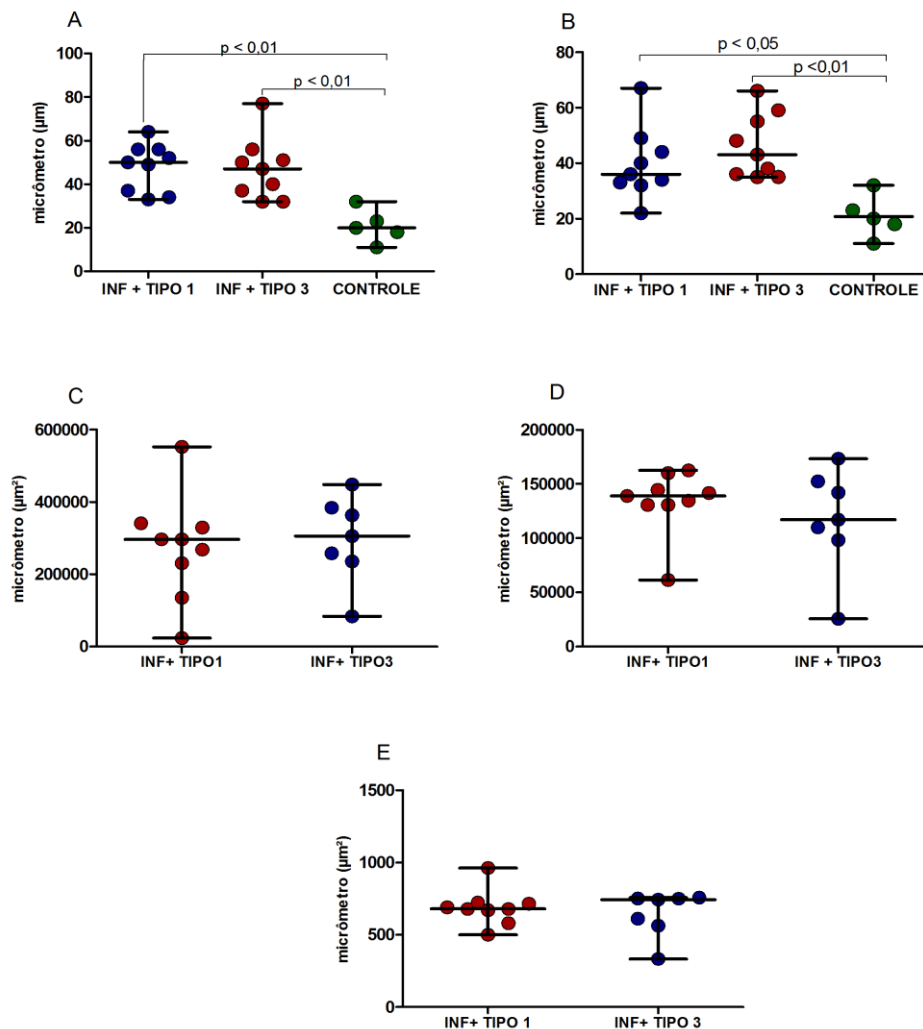


**Figura 12.** Análise morfométrica dos linfonodos poplíteos de cães com infecção ativa, não ativa por *Leishmania infantum* e controle (A) cápsula; (B) seio subcapsular, Teste Kruskal Wallis  $p < 0,05$   $p < 0,01$ . (C) área do folículo secundário; centro germinativo do folículo secundário; (D) diâmetro médio do folículo secundário, Teste Mann Whitney.



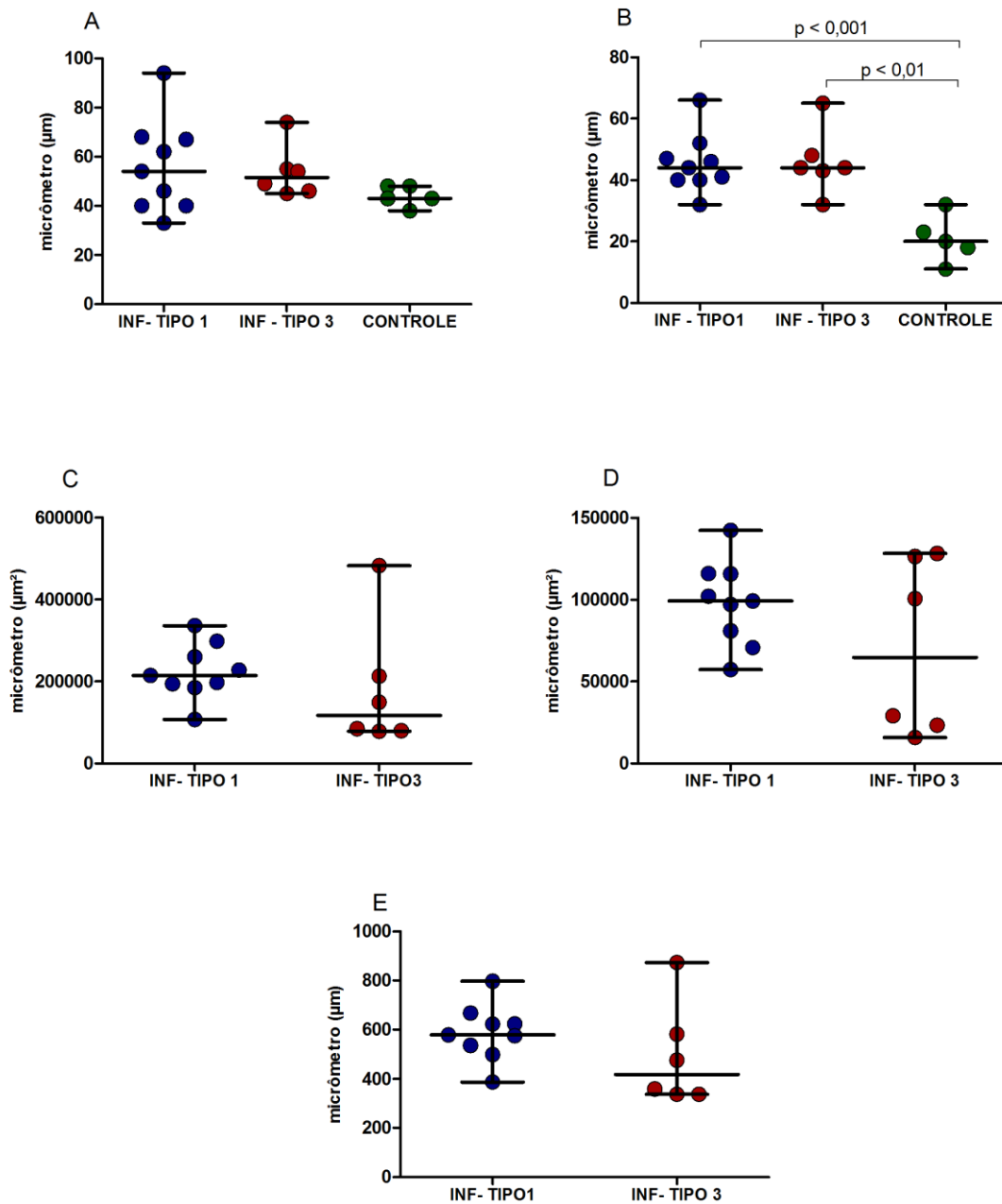
### 5.4.2 Em relação ao tipo de infecção associada ao tipo de organização da polpa branca esplênica

Animais com infecção ativa baço TIPO 1 e baço TIPO 3 apresentaram cápsula (Figura 13A Teste ANOVA  $p < 0,01$ ) e seio subcapsular de seus linfonodos (Figura 13B Teste ANOVA  $p < 0,05$   $p < 0,01$ ) maiores quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre os linfonodos de animais com infecção ativa baço TIPO 1 e TIPO 3 em relação a cápsula, seio subcapsular, assim como na área do folículo secundário (Figura 13C Teste Mann Whitney), centro germinativo do folículo secundário (Figura 13D Teste Mann Whitney) e diâmetro médio do folículo secundário (Figura 8E Teste Mann Whitney).



**Figura 13.** Análise morfométrica de linfonodos poplíteos de cães com infecção ativa por *Leishmania infantum* e com baço TIPO 1 e TIPO 3 e controle **(A)** cápsula; **(B)** seio subcapsular, (Teste Kruskal Wallis  $p < 0,05$   $p < 0,01$ ). **(C)** área do folículo secundário (teste T); centro germinativo do folículo secundário (teste T); **(D)** diâmetro médio do folículo secundário (teste T)

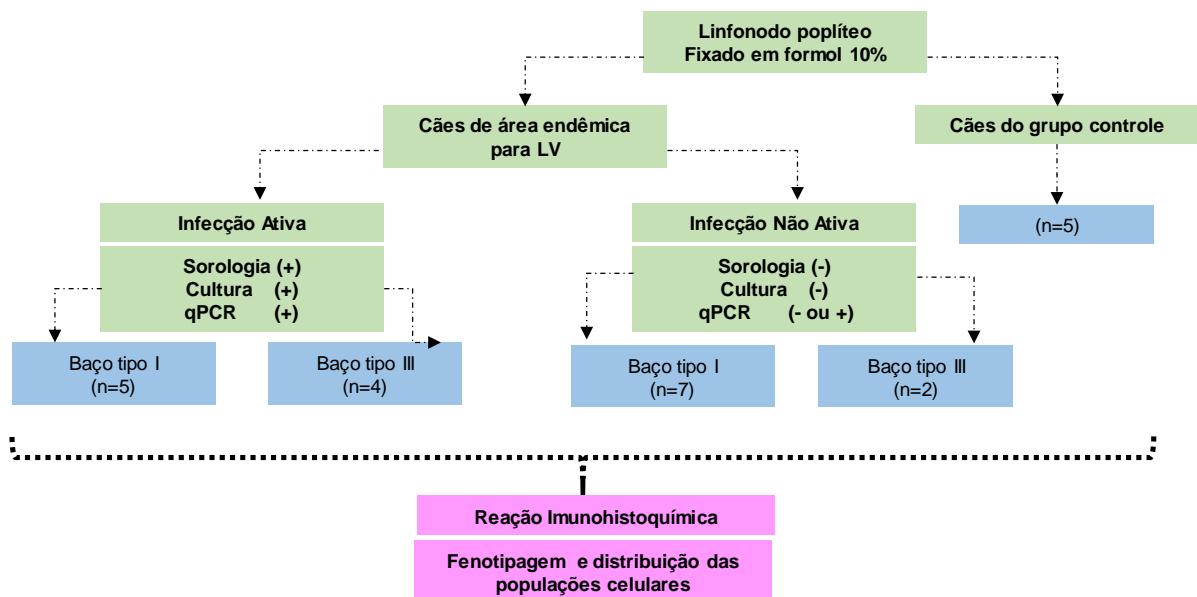
Ambos os linfonodos de animais com baço TIPO 1 e TIPO 3 apresentaram maior dilatação do seio subcapsular em relação ao grupo dos linfonodos controle (Figura 14B, Teste ANOVA). Em relação a cápsula (Figura 14A), área do folículo secundário (Figura 14C), centro germinativo (Figura 14D) e diâmetro médio do folículo secundário (Figura 14E), não houve diferenças estatísticas entre os grupos (teste T).



**Figura 14.** Análise morfométrica dos linfonodos poplíteos de cães com infecção não ativa por *Leishmania infantum* e baço TIPO 1, TIPO 3 e controle. **(A)** cápsula; **(B)** seio subcapsular, ANOVA  $p < 0,01$   $p < 0,001$  **(C)** área do folículo secundário (Teste T); centro germinativo do folículo secundário (teste T); **(D)** diâmetro médio do folículo secundário (Teste T).

## 5.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA QUANTITATIVA DA DENSIDADE CELULAR

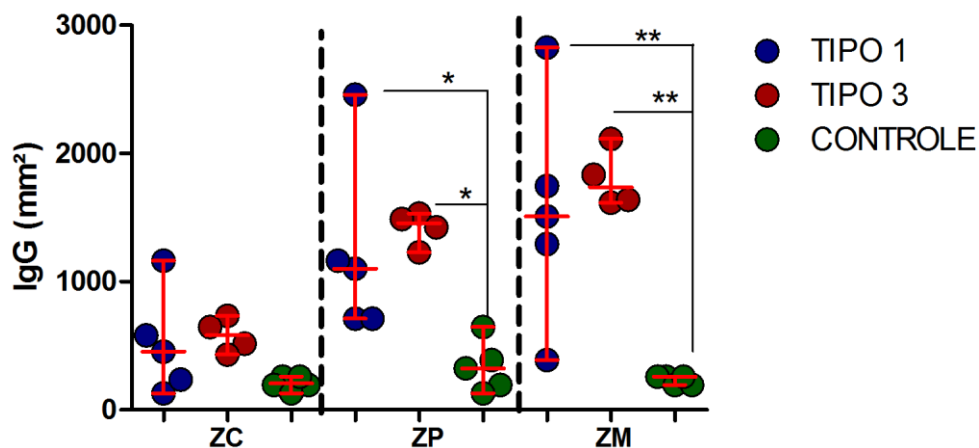
Em algumas secções de linfonodos poplíteos, não foi possível realizar o procedimento de imuno-histoquímica. Devido ao baixo número de secções nos animais com infecção não ativa e com baço tipo 3, não foi possível realiza a comparação com base na desorganização da polpa branca esplênica. Sendo assim, comparamos o grupo infecção não ativa somente com o grupo controle. A figura 15 mostra o novo delineamento experimental para imuno-histoquímica.



**Figura 15.** Delineamento experimental para Imuno-histoquímica

### 5.5.1 Com infecção ativa e com base na desorganização da polpa branca esplênica

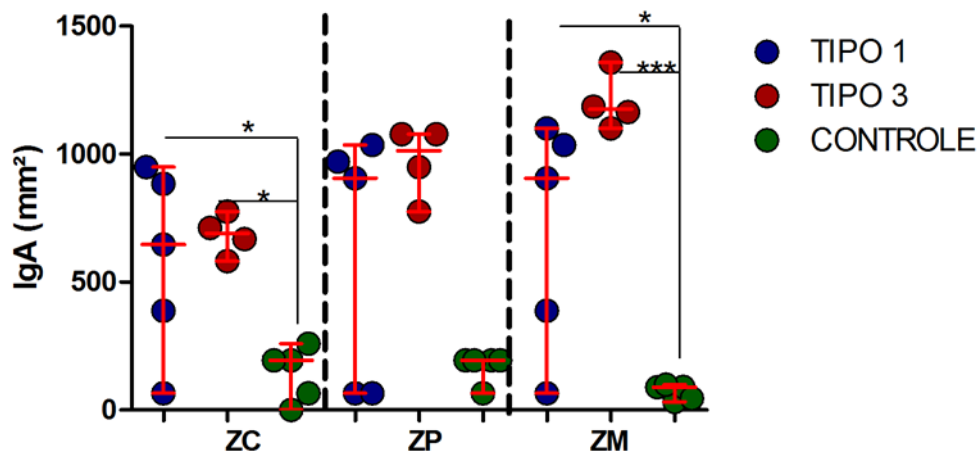
A densidade de plasmócitos secretores de IgG foi maior nas zonas medulares dos linfonodos de animais que apresentavam baço TIPO 1 ( $2825 \pm 388$  células por  $\text{mm}^2$ ) e baço TIPO 3 ( $2113 \pm 1617$  células por  $\text{mm}^2$ ) em comparação ao grupo controle ( $259 \pm 194$  células por  $\text{mm}^2$ ). Linfonodos de cães com baço TIPO 1 ( $2458 \pm 712$  células por  $\text{mm}^2$ ) e TIPO 3 ( $1531 \pm 1229$  células por  $\text{mm}^2$ ) também apresentaram um aumento de densidade destes plasmócitos em comparação ao grupo controle ( $647 \pm 129$  células por  $\text{mm}^2$ ) na zona paracortical. Essas diferenças foram estatisticamente significantes (teste ANOVA, Figura 16).



**Figura 16. Densidade de plasmócitos secretores de IgG.** Número de células IgG por mm<sup>2</sup>, nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção ativa e com baço TIPO 1 e TIPO 3. ZC = Zona cortical, ZP= zona paracortical, ZM= zona medular. \*p<0,05 \*\*p<0,01

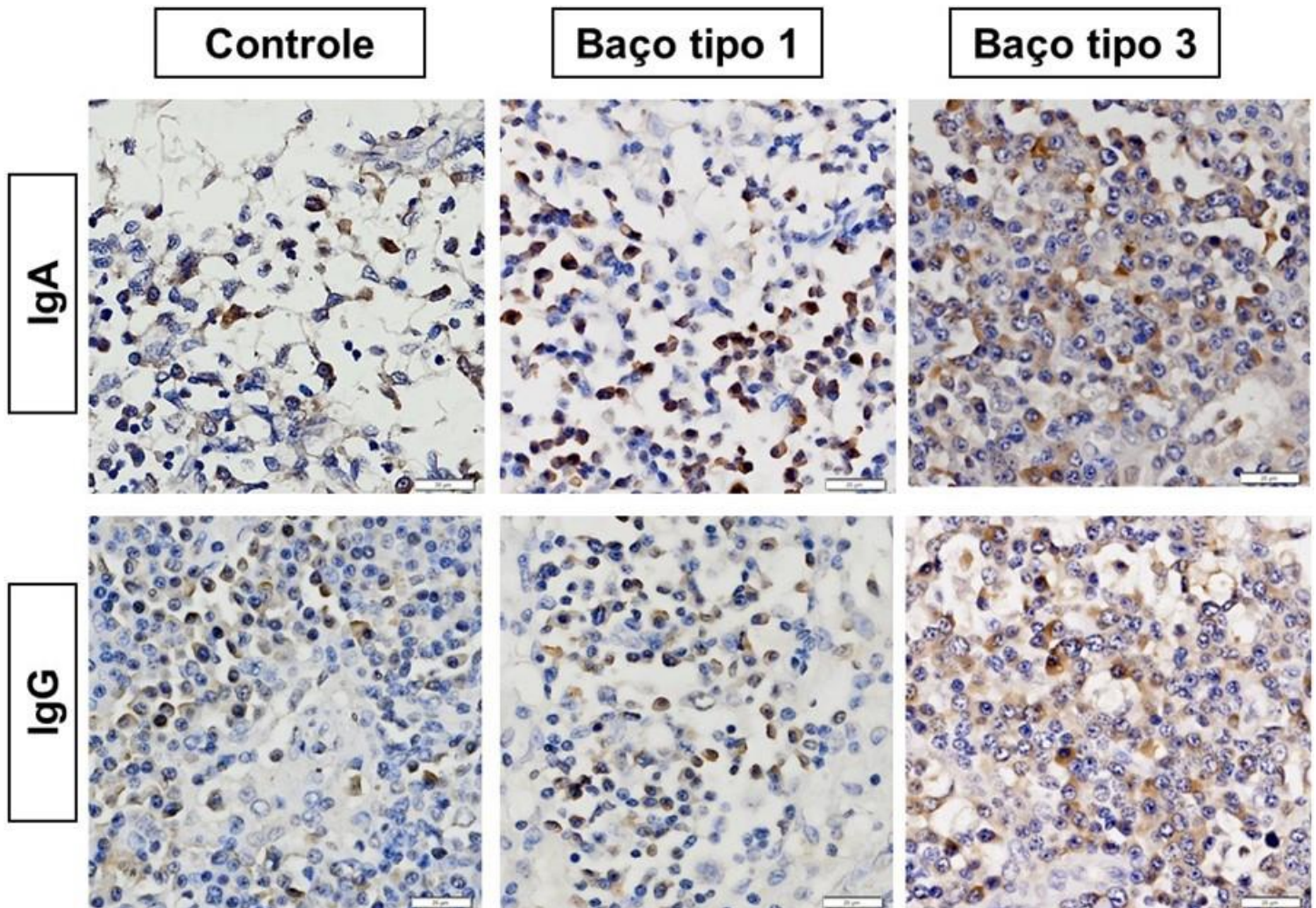
A densidade média de plasmócitos secretores de IgA foi maior nas regiões medulares dos linfonodos de cães que apresentaram baço TIPO 3 (1358 ± 1110 células por mm<sup>2</sup>) e baço TIPO 1 (1110 ± 65 células por mm<sup>2</sup>) em comparação ao grupo controle (1110 ± 65 células por mm<sup>2</sup>).

Também foi observada maiores densidades destes plasmócitos, nas zonas corticais de linfonodos de cães com TIPO 1 (949 ± 65 células por mm<sup>2</sup>) e TIPO 3 (776 ± 552 células por mm<sup>2</sup>) quando comparados ao grupo controle (259 células por mm<sup>2</sup>). Essa diferença foi estatisticamente significativa (teste ANOVA, Figura 17).



**Figura 17. Densidade de plasmócitos secretores de IgA.** Número de células IgA+ por mm<sup>2</sup>, nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção ativa e com baço TIPO 1 e TIPO 3. ZC = Zona cortical, ZP= zona paracortical, ZM= zona medular. Densidade de plasmócitos secretores de IgA. \*p < 0,05

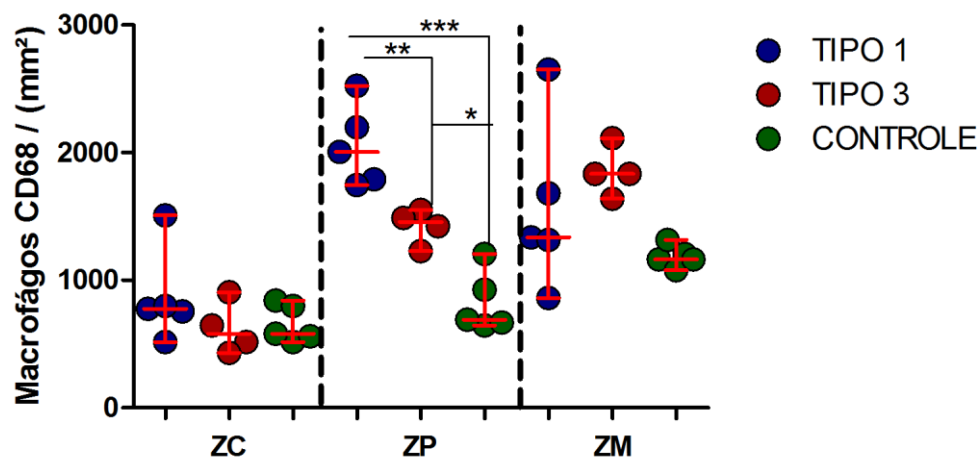
A figura 18 ilustra as marcações de plasmócitos secretores de IgA e IgG em linfonodos de cães com baço organizado (TIPO1), desorganizado (TIPO 3) e do grupo controle.



**Figura 18. Distribuição de plasmócitos secretores de IgA e IgG.** Fotografias representativas dos linfonodos de cães com infecção ativa e baço TIPO1, TIPO 3 e grupo controle marcados com anticorpo específico (400X)



A densidade média de macrófagos foi maior na zona paracortical de linfonodos de cães com baço TIPO 1 ( $2523 \pm 1747$  células por  $\text{mm}^2$ ) quando comparado aos linfonodos de cães com baço TIPO 3 ( $1552 \pm 1229$  células por  $\text{mm}^2$ ) e controle ( $1207 \pm 647$  células por  $\text{mm}^2$ ). Os linfonodos de cães com baço TIPO 3 apresentaram um aumento de macrófagos na zona paracortical em relação ao grupo controle. Essas diferenças foram estatisticamente significantes (teste ANOVA Figura 19).

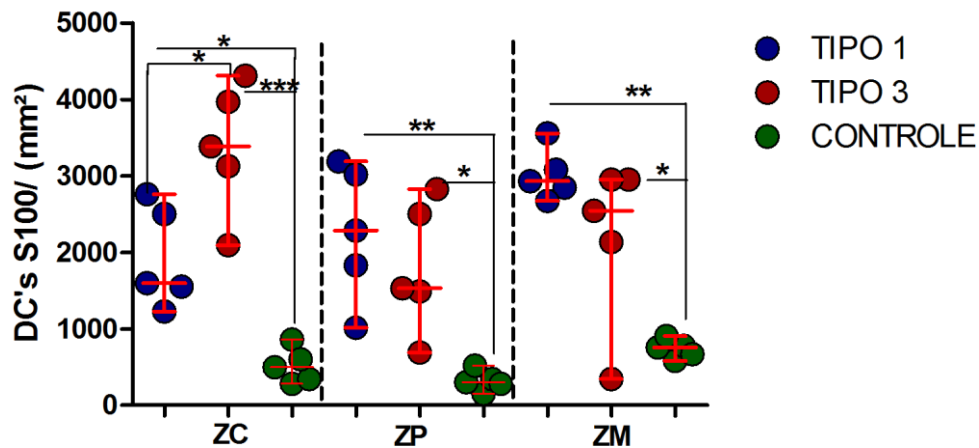


A

**Figura 19. Densidade de macrófagos.** Número de CD68 por  $\text{mm}^2$ , nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção ativa e com baço TIPO 1 e TIPO 3. ZC = Zona cortical, ZP= zona paracortical, ZM= zona medular. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

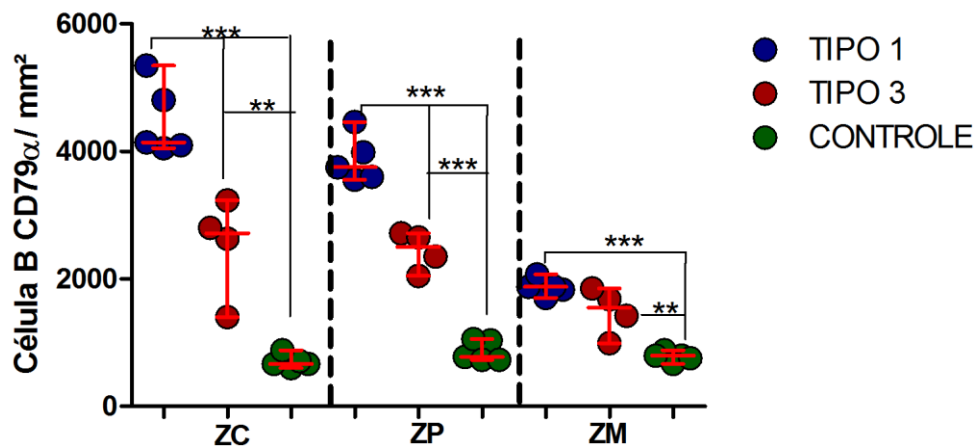
densidade de células dendríticas (S100) foi maior na zona cortical dos linfonodos de cães com baço TIPO 3 ( $4312 \pm 2092$  células por  $\text{mm}^2$ ) quando comparados com os linfonodos dos animais com baço TIPO 1 ( $2760 \pm 1229$  células por  $\text{mm}^2$ ) e com cães do grupo controle ( $862 \pm 280$  células por  $\text{mm}^2$ ).

Nas zonas paracortical e medular dos linfonodos de cães com baço TIPO 1, a densidade de células dendríticas ( $3191 \pm 1013$  células por  $\text{mm}^2$  /  $3358 \pm 2674$  células por  $\text{mm}^2$ , respectivamente) foram maiores que nos linfonodos de cães com baço TIPO 3 ( $2825 \pm 690$  e  $2954 \pm 345$  células por  $\text{mm}^2$ , respectivamente) e grupo controle ( $517 \pm 151$  e  $906 \pm 582$  células por  $\text{mm}^2$ , respectivamente). Essas diferenças foram estatisticamente significantes (teste ANOVA Figura 20).



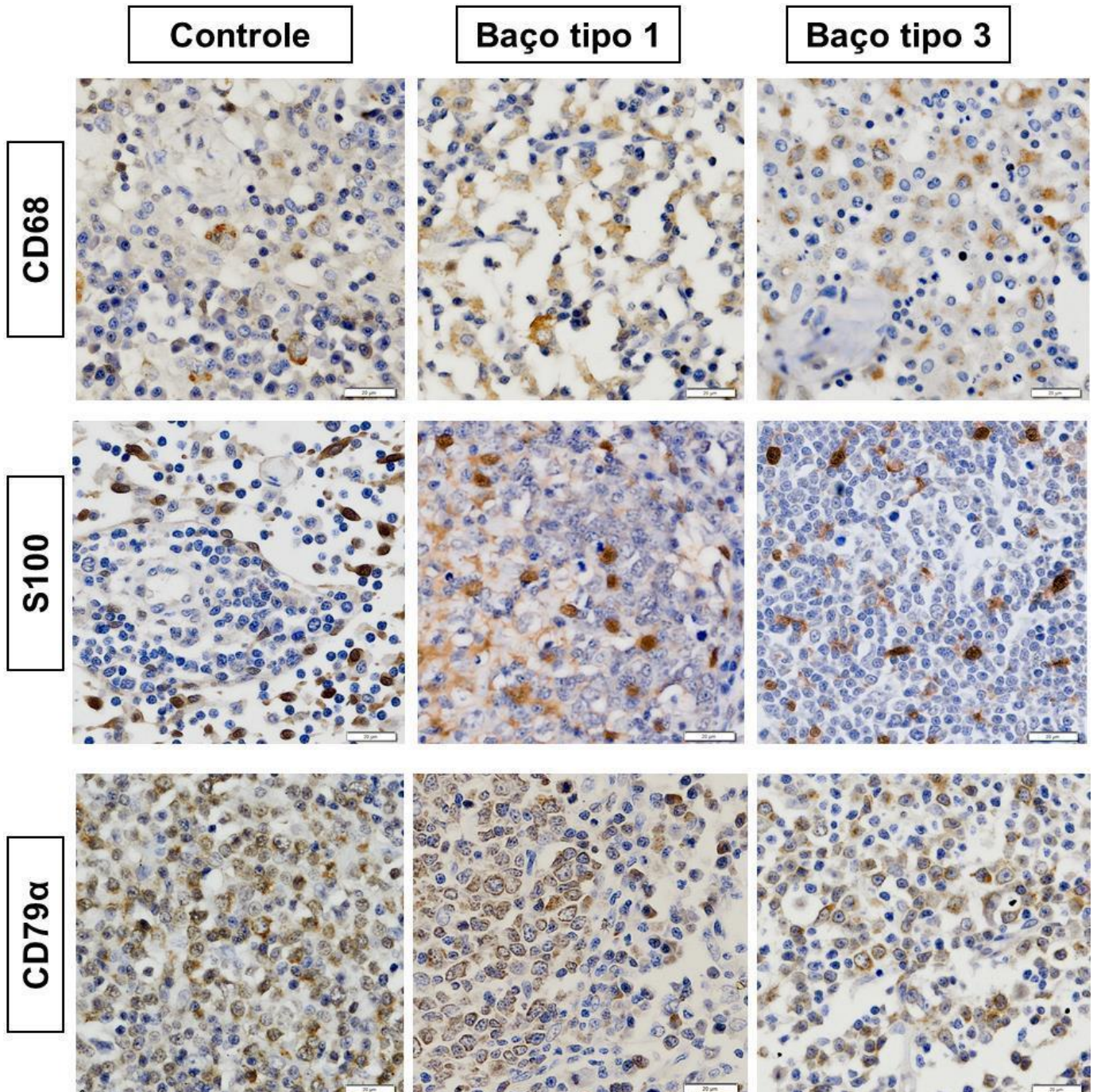
**Figura 20. Densidade de células dendríticas.** Número de células S100 por mm<sup>2</sup>, nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção ativa e com baço TIPO 1 e TIPO 3. ZC = Zona cortical, ZP= zona paracortical, ZM= zona medular. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

Os linfonodos de cães com baço TIPO 1 apresentaram densidades celulares maiores de células B nas regiões cortical e paracortical ( $5347 \pm 4054$  e  $4463 \pm 3558$  células por mm<sup>2</sup>, respectivamente), quando comparados aos linfonodos de animais com baço TIPO 3 ( $3234 \pm 1402$  e  $2717 \pm 2048$  células por mm<sup>2</sup>) e grupo controle ( $884 \pm 604$  e  $1057 \pm 733$  células por mm<sup>2</sup>, respectivamente). Na zona medular ambos os grupos de linfonodos com baço TIPO 1 ( $2070 \pm 1703$  células por mm<sup>2</sup>) e com baço TIPO 3 ( $1854 \pm 992$  células por mm<sup>2</sup>) apresentaram maiores densidades de células B quando comparado ao grupo controle ( $884 \pm 668$  células por mm<sup>2</sup>). Essas diferenças foram estatisticamente significantes (teste ANOVA Figura 21).



**Figura 21. Densidade de células B.** Número de células CD79α mm<sup>2</sup>, nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção ativa e com baço TIPO 1 e TIPO 3. ZC = Zona cortical, ZP= zona paracortical, ZM= zona medular. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

A figura 22 ilustra as marcações de macrófagos (CD68), células dendríticas (s100) e linfócitos B (CD79 $\alpha$ ) em linfonodos de cães com infecção ativa e com baço organizado (TIPO1), desorganizado (TIPO 3) e do grupo controle.

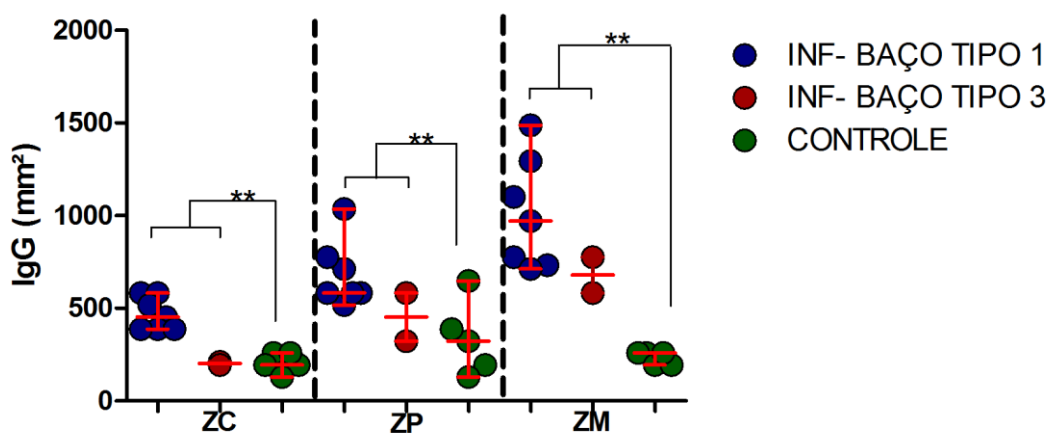


**Figura 22. Distribuição de macrófagos, células dendríticas e linfócitos B.** Fotografias representativas das secções marcadas dos linfonodos de cães com infecção ativa com baço tipo 1, baço tipo 3 e grupo controle marcados com anticorpo específico (400x)



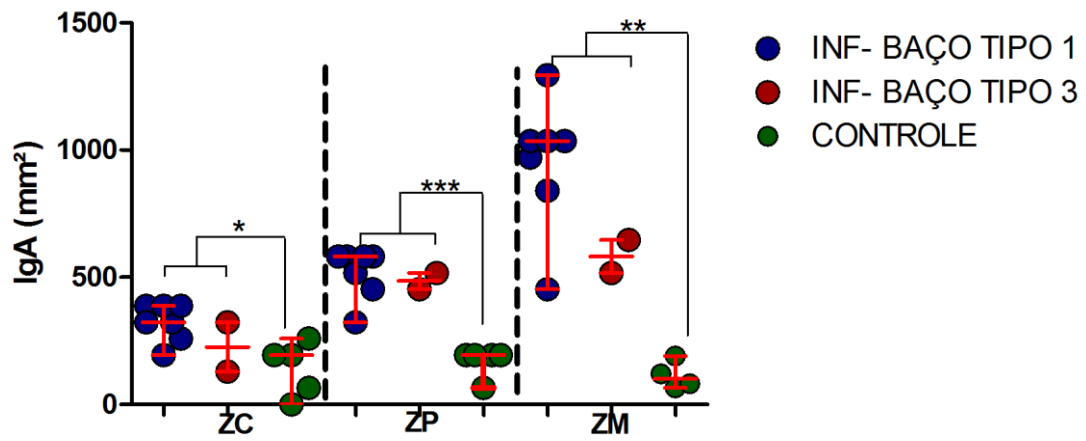
### 5.5.2 Com infecção não ativa

Os linfonodos de cães com infecção não ativa apresentaram maiores densidades de plasmócitos secretores de IgG nas zonas cortical ( $582 \pm 194$  células por  $\text{mm}^2$ ), paracortical ( $1035 \pm 323$  células por  $\text{mm}^2$ ) e medular ( $1488 \pm 582$  células por  $\text{mm}^2$ ), quando comparados aos cães do grupo controle ( $259 \pm 129$ ,  $647 \pm 129$ ,  $259 \pm 193$ , respectivamente). Essas diferenças foram estatisticamente significantes ( $p < 0,01$  teste T Figura 23).



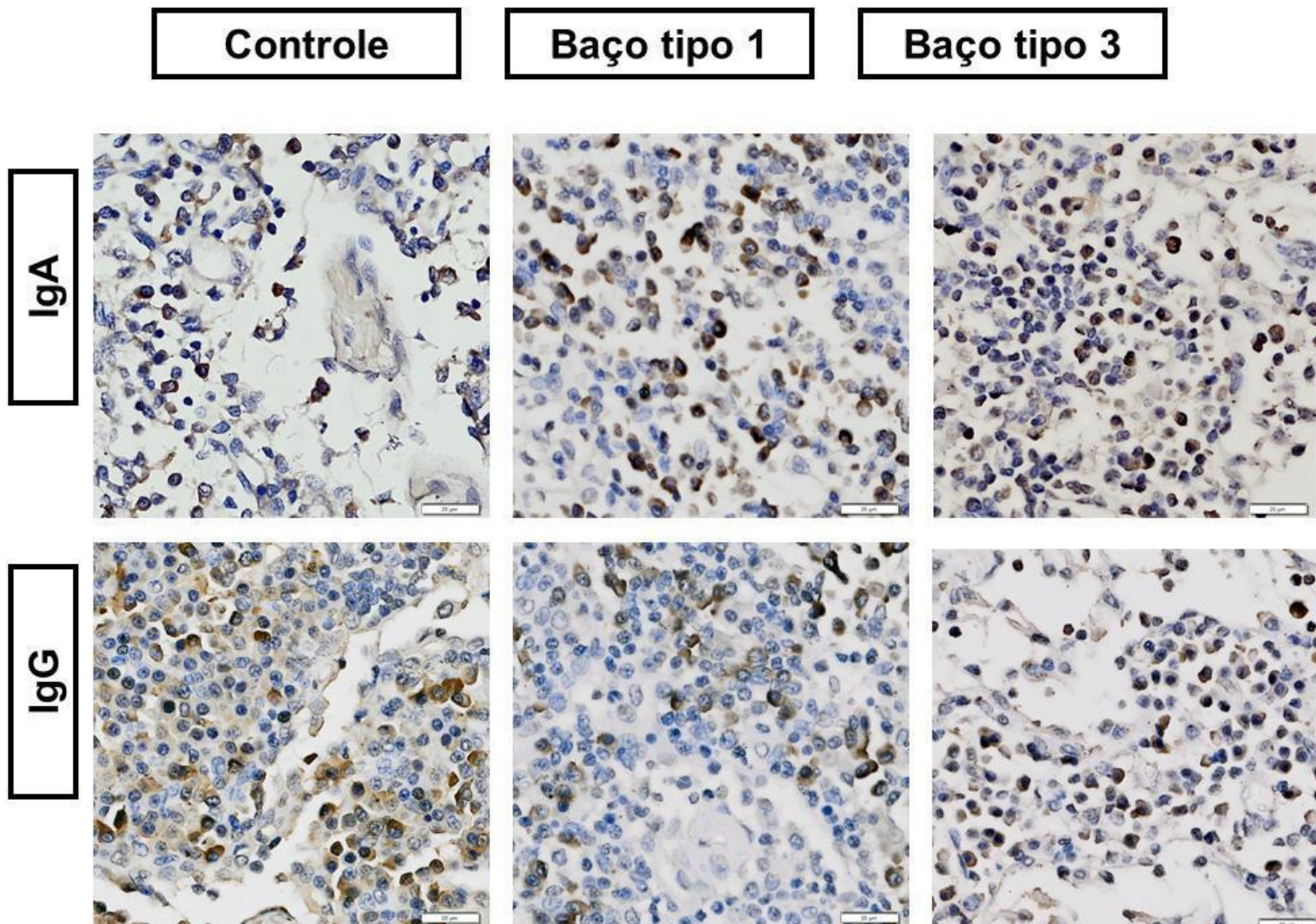
**Figura 23. Densidade de plasmócitos secretores de IgG.** Número de células IgG por  $\text{mm}^2$ , nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção não ativa e grupo controle. ZC = Zona cortical, ZP= zona paracortical, ZM= zona medular  $**p < 0,01$ .

Em relação a densidade de plasmócitos secretores de IgA, estes animais também apresentaram nas três zonas (cortical, paracortical e medular) maiores densidades desta célula ( $388 \pm 129$ ,  $582 \pm 323$  e  $1035 \pm 453$  células por  $\text{mm}^2$ , respectivamente) em comparação ao grupo controle ( $194 \pm 65$ ,  $194 \pm 65$  e  $190 \pm 65$  células por  $\text{mm}^2$ ) respectivamente. Essas diferenças foram estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  teste T Figura 24).



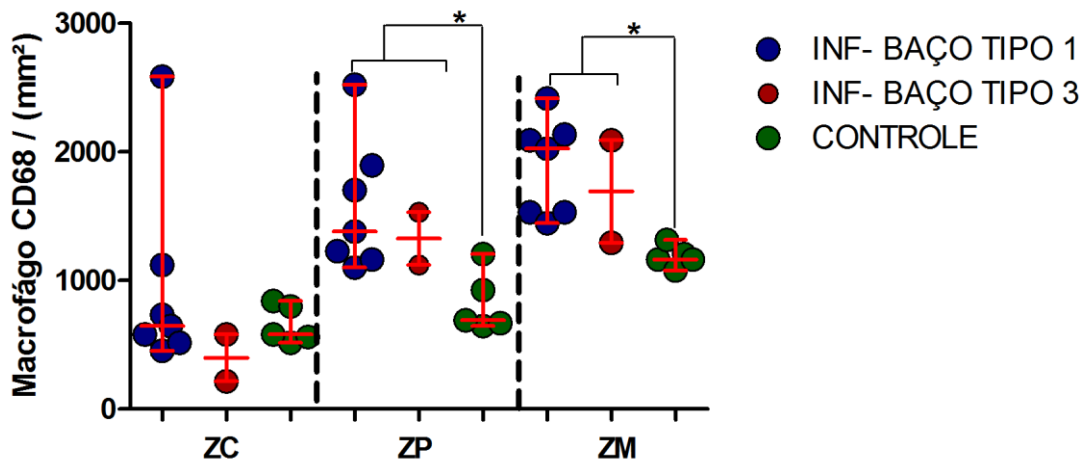
**Figura 24. Densidade de plasmócitos secretores de IgA.** Número de células IgA por mm<sup>2</sup>, nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção não ativa e grupo controle. **ZC** = Zona cortical, **ZP**= zona paracortical, **ZM**= zona medular \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

A figura 25 ilustra marcações de plasmócitos secretores de IgG e IgA em linfonodos de cães com baço organizado (TIPO1), desorganizado (TIPO 3) e do grupo controle.



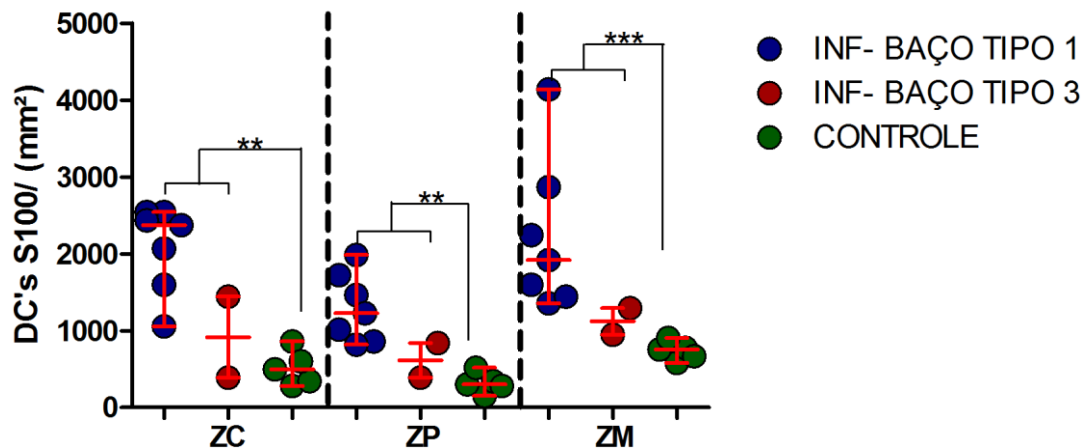
**Figura 25. Distribuição de plasmócitos secretores de IgA e IgG.** Fotografias representativas dos linfonodos de cães com infecção não ativa e baço TIPO1, TIPO 3 e grupo controle marcados com anticorpo específico (400X)

A densidade de macrófagos (células CD68) foi maior nas zonas cortical, paracortical e medular, nos linfonodos de cães com infecção não ativa quando comparadas ao grupo controle houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$  teste T, Figura 26) nas zonas paracortical ( $2523 \pm 1100$  células por  $\text{mm}^2$ ) e na zona medular ( $2415 \pm 1294$  células por  $\text{mm}^2$ ) em relação ao controle ( $1207 \pm 647$  células por  $\text{mm}^2$  e  $1207 \pm 1078$  células por  $\text{mm}^2$ , respectivamente).



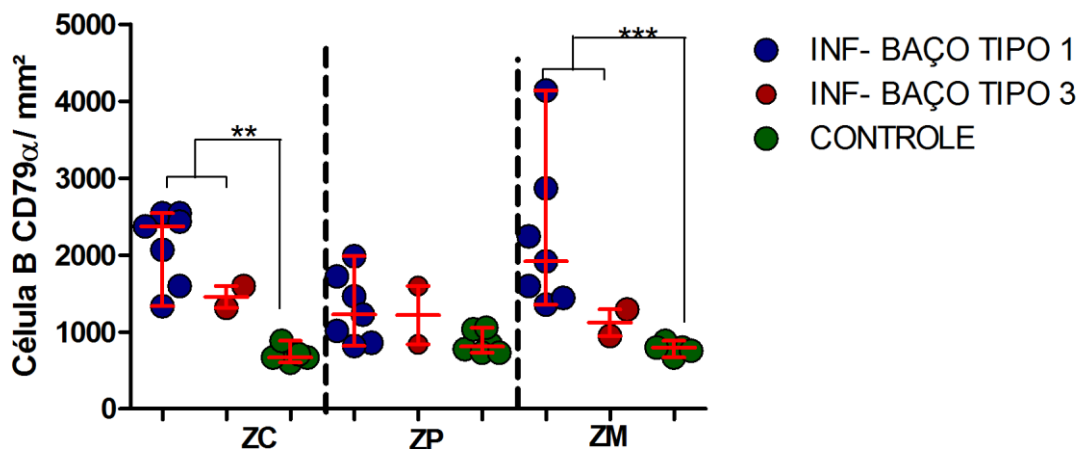
**Figura 26. Densidade macrófagos.** Número de células CD68 por  $\text{mm}^2$ , nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção não ativa e no grupo controle. **ZC** = Zona cortical, **ZP** = zona paracortical, **ZM** = zona medular. \* $p < 0,05$

A densidade de células dendríticas (células S100) foi maior na zona medular ( $4140 \pm 949$  células por  $\text{mm}^2$ ), seguido das zonas paracortical ( $1984 \pm 388$  células por  $\text{mm}^2$ ) e cortical ( $2544 \pm 388$  células por  $\text{mm}^2$ ) dos linfonodos de cães com infecção não ativa quando comparadas as mesmas regiões do grupo controle ( $906 \pm 502$ ,  $517 \pm 151$  e  $862 \pm 280$  células por  $\text{mm}^2$ ). Essas diferenças foram estatisticamente significantes ( $p < 0,01$   $p < 0,001$  Figura 27 teste T).



**Figura 27. Densidade de células dendríticas.** Número de células S100 por mm<sup>2</sup>, nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção ativa e com baço TIPO 1 e TIPO 3. **ZC**= Zona cortical, **ZP**= zona paracortical, **ZM**= zona medular. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.

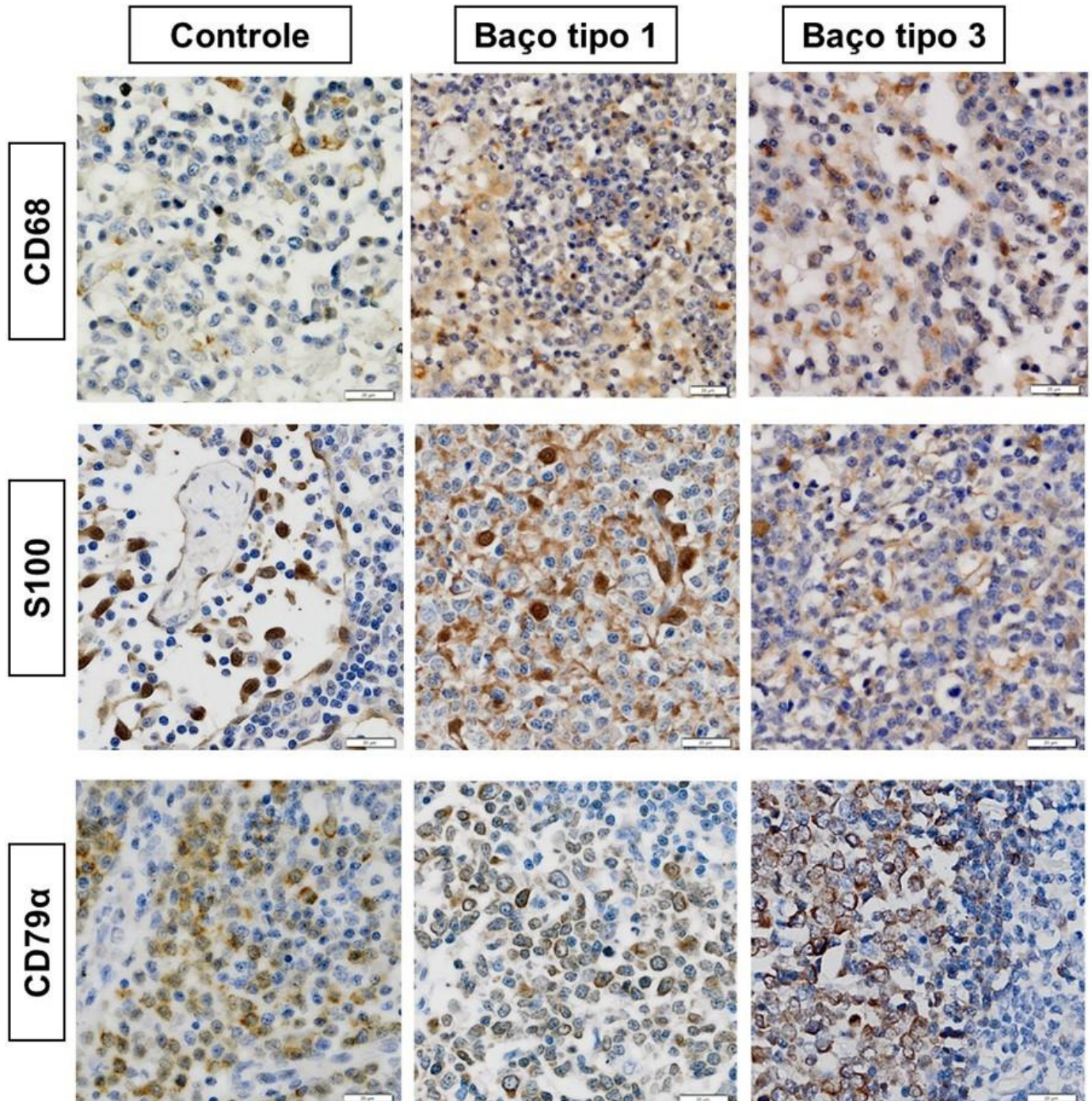
A densidade de células B (CD79 $\alpha$ ) foi maior na zona medular e cortical (2868  $\pm$  668 e 2544  $\pm$  604 células por mm<sup>2</sup>, respectivamente) nos linfonodos dos animais com infecção não ativa quando comparado ao grupo controle (884  $\pm$  668 e 1035  $\pm$  733 células por mm<sup>2</sup>, respectivamente). Essas diferenças foram estatisticamente significantes entre os dois grupos (p<0,01 p<0,001 Teste T Figura 28).



**Figura 28. Densidade de células B.** Número de células CD79 $\alpha$  mm<sup>2</sup>, nos diferentes compartimentos de linfonodos de cães com infecção não ativa e cães do grupo controle. **ZC** = Zona cortical, **ZP**= zona paracortical, **ZM**= zona medular. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.



A figura 29 ilustra marcações de macrófagos (CD68), células dendríticas (s100) e linfócitos B (CD79 $\alpha$ ) em linfonodos de cães com infecção não ativa e com baço organizado (TIPO1), desorganizado (TIPO 3) e do grupo controle.



**Figura 29. Distribuição de macrófagos, células dendríticas e linfócitos B.** Fotografias representativas das secções marcadas dos linfonodos de cães com infecção não ativa com baço tipo 1, baço tipo 3 e grupo controle marcados com anticorpo específico (400x)

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos que cães com desorganização da polpa branca esplênica (baço tipo 3) associada à leishmaniose visceral, independente do tipo de infecção (ativa ou não ativa), apresentam maiores números de sinais clínicos, como conjuntivite, emagrecimento, alterações em mucosas, alopecia e onicogrifose. Como já foi descrito na literatura por Lima e colaboradores (2014), nos animais com evidência de infecção de *Leishmania*, a desorganização do tecido linfoide no baço está fortemente associada com as características clínicas. Os cães que apresentavam cultura positiva para *Leishmania* apresentaram maior frequência de aspecto corpóreo magro a caquético. Esses achados são semelhantes aos obtidos por Santana e colaboradores (2008), que observaram que desorganização da polpa branca esplênica foi mais frequente nos animais que apresentavam emagrecimento (SANTANA *et al.*, 2008) (SILVA *et al.*, 2014). Segundo Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2012) formas graves da doença estão associadas a desorganização do baço nos casos de infecção por *Leishmania*.

Existem poucos estudos sobre a histopatologia dos linfonodos na leishmaniose canina (KEENAN *et al.*, 1984, Martinez-Moreno *et al.*, 1993, TAFURI *et al.*, 2001, GIUNCHETTI *et al.*, 2007). No presente estudo, mostramos que linfonodos poplíteos de animais com infecção ativa e não ativa por *Leishmania infantum* apresentaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição do infiltrado capsular, variando de multifocal a difuso, mostrando que a maioria dos linfonodos apresentaram linfadenite crônica com infiltrado plasmocítico ou misto, envolvendo basicamente a toda a arquitetura da cápsula. Esses achados são semelhantes ao encontrado por Tafuri e colaboradores (2004) que observaram que a maioria das cápsulas dos linfonodos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* apresentavam um infiltrado inflamatório crônico. O quadro histopatológico foi semelhante para todos os linfonodos de cães infectados naturalmente por *Leishmania*, independentes da posição anatômica (LIMA *et al.*, 2004).

Na região dos cordões medulares, encontramos um infiltrado plasmocítico predominando em todos os grupos. Esses achados também estão de acordo com LIMA e colaboradores (2004) que relataram um alto percentual dessas células nos cordões medulares de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. A

grande quantidade de plasmócitos é achado frequente em linfonodos, assim como em outros órgãos como o baço de cães infectados por *Leishmania* (TAFURI, 1995). Esta característica também tem sido demonstrada na leishmaniose visceral humana, pois o infiltrado de plasmócitos é esperado devido a ativação policlonal e proliferação de células B, que induz aumento destas células no córtex, centro germinativo e cordões medulares nos linfonodos (MOREIRA *et al.*, 2010). A hiperplasia dos plasmócitos foi considerada a característica histológica mais relevante na região medular dos linfonodos de cães quando comparados com a frequência de macrófagos e linfócitos (GIUNCHETTI *et al.*, 2007).

A histiocitose em seios medulares também foi um achado frequente nos linfonodos poplíteos nos animais com infecção não ativa e do grupo controle deste estudo, diferindo em relação a sua distribuição e intensidade entre os grupos. A hipertrofia e hiperplasia de macrófagos na região dos seios medulares explicam a linfadenomegalia observada clinicamente (MOREIRA *et al.*, 2010 LIMA *et al.*, 2004). Linfonodos de cães naturalmente infectados podem apresentar hipertrofia nos seios medulares, provavelmente devido a dilatação dos seios causada pela hiperplasia de macrófagos nesta região (KONDO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2013). Essas características também estão presentes na leishmaniose visceral humana (VERESS 1977) e em infecções em hamsters (COLBETT *et al.*, 1992).

Neste estudo, a presença de granulomas em linfonodos ocorreu apenas em 6% dos animais infectados por *Leishmania infantum*. Contrariamente, Vasconcelos e colaboradores (2016), encontraram essa estrutura em 68% de linfonodos de animais naturalmente infectados, considerando sua presença como fator de cronicidade do processo patológico. Outros autores, também identificaram distorções significativas na arquitetura do linfonodo devido a presença de granulomas, com perda de morfologia entre regiões corticais e medulares (MOREIRA *et al.*, 2010).

Depósitos de hemossiderina também foi um achado histopatológico com baixa frequência nos linfonodos poplíteos dos animais deste estudo (15%). No homem e nos cães, a anemia é frequente na LV e está associada à insuficiência renal crônica, a hipoplasia ou aplasia da medula pelo acentuado infiltrado celular e parasitário (COSTA-VAL *et al.*, 2007), a anemia hemolítica imunomediada, pela ativação de linfócitos B, pelo aumento da permeabilidade da membrana do eritrócito, por citocinas



que interferem na ação da eritropoietina e pelo sequestro de eritrócitos para o baço (MAHAJAN e MARWAHA, 2007).

Achados na literatura demonstram que linfonodos regionais também são frequentemente parasitados pela *Leishmania sp* (VASCONCELOS *et al.*, 2016, MOREIRA *et al.*, 2010, GIUNCHETTI *et al.*, 2007 REIS *et al.*, 2006). Entretanto, encontramos baixa presença (12%) de parasitos nas secções de H&E de linfonodo poplíteo de cães de área endêmica. Em um estudo de Barrouin-Melo e colaboradores (2004), foi mostrado que a sensibilidade das culturas de baço para detecção de *Leishmania* foi de 97,9% em comparação as culturas de linfonodos poplíteos de 64 cães de área endêmica, que apresentou sensibilidade de 25%, reforçando nossos dados sobre a presença de *Leishmania*. Outro fator que afeta a capacidade de detectar *Leishmania* em diferentes tecidos é o estado imunológico do hospedeiro. A disseminação de *Leishmania* para sítios incomuns e alta carga parasitária são observados em hospedeiros com comprometimento grave da resposta imunológica (ALVAR *et al.*, 1997), o que não foi o caso dos animais do presente estudo.

Após estudar dois grupos somente quanto a infecção em linfonodos poplíteos de cães naturalmente infectados por *Leishmania*, foi possível associar os resultados obtidos com a organização da polpa branca. Linfonodos de cães com infecção ativa e com diferentes graus de organização diferiram apenas quanto a distribuição do infiltrado capsular, mostrando que os linfonodos com baço TIPO 3 apresentaram em suas cápsulas um infiltrado misto difuso, enquanto os linfonodos de cães com baço TIPO 1 apresentaram em sua maioria um infiltrado plasmócítico multifocal. Esses resultados mostram que não há uma associação entre o grau de organização da polpa branca esplênica com as alterações encontradas na cápsula, cordões e seios medulares nos linfonodos. Já linfonodos de cães com infecção não ativa associada a organização da polpa branca, diferiram somente quanto a histiocitose. Os linfonodos de cães com infecção não ativa e baço TIPO1 apresentaram pouca histiocitose, em comparação aos linfonodos de cães com baço TIPO 3, onde todos apresentavam essa alteração, variando a intensidade de discreto a moderado, e a distribuição de focal a difusa. A presença de infiltração histiocítica também podem estar associadas a outros fatores como inflamação crônica (DI MATTIA *et al.*, 2018) e também associada a animais com maior carga parasitária (VASCONCELOS *et al.*, 2016).

São escassos os estudos que avaliam a morfometria em linfonodos de cães infectados com *Leishmania*. Os achados decorrentes da análise morfométrica mostraram que os linfonodos de cães com infecção ativa apresentaram uma maior dilatação no seio subcapsular em relação aos linfonodos de cães com infecção não ativa e grupo controle, sugerindo que os linfonodos destes animais estão mais reativos. Esses resultados divergiram dos achados de Kondo e colaboradores (2009), que ao realizar a mesma análise mostrou que o espessamento de ambos os parâmetros analisados não foi significativo entre o grupo controle e infectado por *Leishmania*. Na avaliação quantitativa de folículos linfoides, não houve diferença entre os grupos quanto a quantidade de folículos linfoides primários e secundários. Porém, a análise morfométrica dos folículos linfoides secundários mostraram que os linfonodos poplíteos dos cães com infecção ativa apresentaram maiores áreas, maiores centros germinativos e maiores diâmetros quando comparados aos linfonodos de cães com infecção não ativa. Esses achados corroboram com Kondo e colaboradores, que mostraram que cães infectados naturalmente por *Leishmania* apresentaram aumentados os mesmos parâmetros nos folículos quando comparado aos cães saudáveis. De modo semelhante, já foi descrito que histologicamente, linfonodos cervicais e poplíteos de cães infectados mostraram hiperplasia nodular (LIMA et al., 2004). Em outros órgãos linfoides, a exemplo o baço, a hiperplasia nodular esteve presente em cães infectados e considerados potencialmente resistentes para LV (SANTANA et al., 2008). Em outro estudo, cães infectados por *Leishmania* exibiram maior percentual de baços com folículos linfoides bem organizados, relacionando a gravidade da manifestação da doença com desestruturação da polpa branca esplênica (LIMA et al., 2014). No nosso estudo, animais do grupo controle, não apresentaram folículos linfoides secundários, sugerindo que essas estruturas não são formadas pois não há estímulo antigênico, uma vez que esses animais tiveram *causa mortis* por outros fatores não associados a doenças infecciosas e neoplásicas.

Esses dados reforçam que linfonodos poplíteos de cães com infecção ativa parecem montar uma resposta antigênica frente a infecção por *Leishmania* em comparação aos cães com infecção não ativa e ao grupo controle.

Neste estudo também associamos as alterações morfométricas encontradas em linfonodos ao tipo de infecção e ao grau de organização da polpa branca esplênica. Foi observado que linfonodos de cães com infecção ativa associados a ambos os

graus de organização esplênica diferem no aumento da espessura da cápsula e na dilatação do seio subcapsular quando comparados ao grupo controle. Na infecção não ativa, ambos os linfonodos de cães com baço TIPO 1 e baço TIPO 3 apresentaram maior dilatação do seio subcapsular quando comparado ao grupo controle. Não houve diferenças entre os linfonodos de cães com baço organizado (baço TIPO 1) e desorganizado (baço TIPO 3) em nenhum dos parâmetros morfométricos estudados com relação ao tipo de infecção, sugerindo que o grau de organização do tecido esplênico não interfere na morfometria dos linfonodos.

Outro objetivo deste estudo foi caracterizar as populações celulares em linfonodos levando em consideração o tipo de infecção e o grau de organização da polpa branca esplênica.

Em um estudo prévio do nosso grupo a frequência de plasmócitos foi maior nos baços de cães com evidência de infecção por *Leishmania* em relação aos não infectados (SANTANA *et al.*, 2008). No presente estudo, além da pesquisa de plasmocitose em LV avaliamos a densidade de plasmócitos produtores de diferentes isotipos de imunoglobulinas nas três diferentes zonas dos linfonodos. Foi observado que os linfonodos de cães com infecção ativa com baço TIPO 1 e TIPO 3 apresentaram maiores densidades de plasmócitos secretores de IgG e IgA, em pelo menos duas zonas do linfonodo quando comparados ao grupo controle. Do mesmo modo, cães com infecção não ativa também apresentaram densidades maiores destas células quando comparados ao grupo controle.

Silva O'Hare (2016) mostrou que cães com infecção ativa e baço desorganizado (TIPO 3) apresentaram maior densidade de plasmócitos secretores de IgG em comparação ao grupo controle, associando o aumento da densidade destas células a desorganização da polpa branca. Diferente dos resultados aqui apresentados, onde os linfonodos de cães com baço TIPO 1 apresentaram maiores densidades de IgG nas zonas cortical, paracortical e medular quando comparados aos linfonodos de cães com baço TIPO 3 e ao grupo controle, sugerindo que a desorganização esplênica acontece primeiro que a desorganização do linfonodo. Os achados da densidade destas células estão associados aos resultados das alterações histopatológicas, que mostraram que em linfonodos, a zona medular é a região onde se encontra maior presença de plasmócitos em cães infectados por *Leishmania*. O aumento de plasmócitos em órgãos linfoides é um achado comum na leishmaniose (VERESS *et*

*al.*,1977; KEENAN *et al.*,1984), e pode estar presente em diferentes estados da doença (VERESS *et al.*, 1983).

Linfonodos de cães com baço TIPO 1 apresentaram maior densidade de macrófagos nas zonas cortical, paracortical e medular em relação aos linfonodos com baço TIPO 3 e ao grupo controle. Macrófagos são células frequentes na infecção causada por *Leishmania spp* e apresentam múltiplas funções, servindo como células hospedeiras na multiplicação do parasito, como célula apresentadora e contribuindo para a morte do parasito (ZER *et al.*, 2001). A perda de populações celulares específicas, tais como macrófagos e linfócitos T podem ser a causa original da desorganização do tecido linfóide, como mostrado em modelos experimentais de leishmaniose visceral (SMELT *et al.*, 1997, ENGWERDA *et al.*,2002). Como já descrito no baço, os macrófagos da zona marginal e as células dendríticas foliculares estão envolvidas nas vias de sinalização que controlam a migração de linfócitos B para o folículo linfóide (KARLSSON *et al.*, 2003). A cadeia de células dendríticas foliculares - CXCL13 - linfócito B da via folicular linfóide é alterada neste órgão em cães com leishmaniose visceral e desorganização do tecido linfóide

Sugerimos que o aumento da densidade desta célula pode estar relacionado ao controle da infecção, uma vez que foi maior nos linfonodos de animais que possuíam o baço organizado.

Sabemos que as células dendríticas são consideradas importante vínculo entre a resposta imune inata e adaptativa numa infecção causada por *Leishmania*. Elas podem capturar um patógeno invasor e migrar para os órgãos linfóides de drenagem mais próximos onde, depois da maturação, apresentam os antígenos processados para ativar as células T, desse modo induzindo a diferenciação das células ativadas em células T efetoras (BIRON *et al.*, 2002; GARG *et al.*, 2007). No presente estudo, linfonodos de cães com baço TIPO 3 apresentaram maior densidade de células dendríticas na zona cortical quando comparado aos cães com baço tipo 1 e ao grupo controle. Esse achado difere do estudo de Silva e colaboradores (2012) que encontrou um número menor destas células em folículos linfóides de cães com baço desorganizado (TIPO 3), atribuindo essa diminuição a baixa expressão da quimiocina CXCL13 e sugerindo que a infecção natural por *Leishmania infantum* é associada com o comprometimento de células dendríticas foliculares, migração de células B,

formação do centro germinativo e com as formas clínicas graves de leishmaniose visceral.

A combinação da redução no número de células dendríticas foliculares e da expressão reduzida de CXCL13 pode sugerir uma relação causal, sendo assim, perda de células dendríticas foliculares pode resultar na redução da produção de CXCL13, que em seguida, pode levar falha na migração de células B e atrofia folicular (SILVA *et al.*, 2012)

Neste estudo, a densidade de células B foi maior na zona cortical e paracortical dos linfonodos de cães com baço TIPO 1 em comparação aos linfonodos de cães com baço TIPO 3 e controle, sugerindo que os folículos linfóides destes cães, nestas regiões estão mais organizados. A organização dos folículos linfóides é mediada pela migração de células B mediada por CXCL13 para o interior do folículo e a presença dessas células nas proximidades de células dendríticas foliculares (FORSTERS *et al.*, 1999). Foi verificado que a expressão de CXCL13 era diminuída em animais que apresentam distúrbio e atrofia dos folículos linfóides e redução ou ausência de centros germinativos foliculares (SILVA *et al.*, 2012).

Animais com infecção não ativa apresentaram maiores densidades de todos os tipos celulares que foram avaliados neste estudo em relação ao grupo controle. Não foi possível comparar esse grupo levando em consideração a organização da polpa branca devido ao baixo número de amostras dos subgrupos.

Nosso estudo, diferentemente de outros, foi considerado a caracterização e desorganização do linfonodo de cães infectados por *Leishmania infantum* associando quando possível a desorganização esplênica (formas graves da doença). Pesquisas futuras são necessárias para estudo de quimiocinas e receptores que podem estar associados a migração dessas células estudadas.

## 7. CONCLUSÕES

1. Linfonodos de cães com infecção ativa apresentaram maior hiperplasia folicular e maior dilatação do seio subcapsular em comparação aos linfonodos de cães com infecção não ativa;
2. Linfonodos de cães com infecção ativa e baço TIPO 1 apresentaram maiores densidades de macrófagos e células B em comparação aos linfonodos de cães com infecção ativa e baço TIPO 3;
3. Linfonodos de cães com infecção ativa e baço TIPO 3 apresentaram maior densidade de células dendríticas em comparação aos linfonodos de cães com infecção ativa e baço TIPO 1;
4. Linfonodos de cães com infecção não ativa apresentaram maior densidade de plasmócitos secretores de IgA e IgG, macrófagos, células dendríticas e célula B quando comparados ao grupo controle;

As alterações morfo e imunofenotípicas em linfonodos não são concomitantes com alterações esplênicas, sugerindo que estes órgãos são alterados em momentos distintos da doença.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, B. C. N. C. *et al.* Alterações estruturais em rins de caninos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, **Rev. Bras. Ciên. Vet.**, vol. 15, n. 1, p. 3-5, 2008.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv. Parasitol.**, v. 31, p. 175-254, 1992.
- ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v.57, p.188, 2008.
- ALVAR, J. *et al.* *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 298-319, 1997.
- BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v. 24, p. 324–330, 2008.
- BAJENOFF M.; GRANJEAUD S.; GUERDER S. The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 715-724, 2003.
- BARBOSA, M. A. *et al.* Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **J. Comp. Pathol.**, v. 145, p. 336–344, 2011.
- BENEDICT, C. A. *et al.* Specific remodeling of splenic architecture by cytomegalovirus. **PLoS Pathogenes**, v. 2, n. 3, p.e16, 2006.
- BRASIL, M.D.S. **Glossário Leishmaniose**. Ministério da Saúde. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1561](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561). 2013. Acesso em: 10 dez. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Epidemiológica. D. D. V. N. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 2014.
- BRITO, F. L. C. *et al.* Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil, **Ciên. Rural**, v. 34, p. 925-929, 2004.
- BIRON, C.A.; SHARMA, O.; KAYE, P.M. Dendritic cells at the host-pathogen interface. **Nature Immunol.**, v. 3, p. 699-702, 2002.
- CAVANAGH L.L., VON ANDRIAN TRAVELLERS U.H., in many guises: the origins and destinations of dendritic cells **Immunol. Cell Biol.**, v. 80, p. 448-462, 2002.
- CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.** 141, 539–543, 1997.

- CORBETT C.E. *et al.* Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 73, p. 417-433, 1992.
- CORBEIL, L. B. *et al.* Canine visceral leishmaniasis with amyloidosis: an immunopathological case study **Clin. Immunol. Immunopathol.** v. 6 p. 165-173, 1976.
- COSTA, C. H. *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 4, Apr, p. 334-337, 2002.
- COSTA-VAL, AP. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) longipalpis infectivity. **Vet. J.**, v. 174, p. 636–643, 2007.
- COURA-VITAL, W. *et al.* Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis **PLoS ONE**, v.7, n. 3, 2014.
- COURTENAY, O. *et al.* Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1314-1320, 2014.
- CYSTER, J. G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs **Science**, v. 286 p. 2098-2102, 1999.
- DANTAS-TORRES, F. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Rev. Saude Publ.**, v. 40, n.3, p. 537-541, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDAO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, p. 151-156, 2006.
- DE ALMEIDA FERREIRA, S. *et al.* Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, e1596, 2012.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 305–318, 2004.
- DE QUEIROZ, N. M. *et al.* Detection of *Leishmania* (L.) *chagasi* in canine skin. **Vet. Parasitol.**, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.
- DIETZE, R. *et al.* Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1240-1242, 1997.
- DI MATTIA, D. *et al.* Retrospective histopathological, immunohistochemical and molecular study of the presence of *Leishmania* spp. in the skin of cats with head and neck ulcerative dermatitis. **Vet. Dermatol.**, v. 29, n. 3, p. 212-e 76, 2018.



DINIZ, S.A. *et al.* Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas **J. Infect. Dev. Ctries**, v. 2, n. 1 p 24-33, 2008.

DUPREY, Z. *et al.* Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 3, Mar, p. 440-446, 2006.

ENGWERDA, C. R. *et al.* 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.

ENSERINK, M. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? **Science**, v. 290, n. 5498, p. 1881-1883, 2000.

FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis, In: **Canine leishmaniasis update**. Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum. Ed. R. Killick-Kendrick, Barcelona, v. 28-31, p. 6-10, 1999.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p. 319-327, 1997.

FORSTER, R. *et al.* A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. **Cell**, v. 87, p. 1037–1047, 1996.

FRANCA-SILVA, J.C. *et al.* Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 111, p. 161–173, 2013.

GARG, R.; TRUDEL, N.; TREMBLAY, M. J. Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. **Trends Parasitol.**, v. 23, p. 317-324, 2007.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. Belo Horizonte. 1993. 202f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1993.

GIUNCHETTI, R.C. *et al.* Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 121, p. 23–33, 2008.

GARSIDE, P. *et al.* Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. **Science**, 281, pp. 96-99, 1998.

GOODNOW C.C. Chance encounters and organized rendez-vous **Immunol. Rev.**, v. 156, p. 5-10, 1997.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1169– 118, 2005.

GRIMALDI, G. *et al.* The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 966-971, 2012.

HARGREAVES, D. C. *et al.* A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements **J. Exp. Med.** v. 194, p. 45-56, 2001.

HANDMAN, E.; BULLEN, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 332-334, 2002.

HERMIDA, M. *et al.* Histological disorganization of spleen compartments and severe visceral leishmaniasis. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, 2018.

ITANO A.A.; M.K. JENKINS Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 733-739, 2003.

JACOB, J.; KASSIR, R.; KELSOE, G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 1165-1175, 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U. C., J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KARLSSON, M.C. *et al.* Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 333-340, 2003.

KELSOE, G. Life and death in germinal centers (redux). **Immunity**, v. 4, p. 107-111, 1996.

KRAUSPENHAR, C. *et al.* Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciê. Rural**, v. 37, 2007.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KEENAN, M. *et al.* Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. **Pathology Vet. Pathol.**, v. 21 p. 80-86, 1984.

KILLICK KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. **Annales Parasitol. Hum. Comp.**, v. 66 Suppl 1, p. 71-74, 1991.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin. Dermatol.**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KONDO, J. *et al.* Histomorphometric analysis of the extracellular matrix of popliteal lymph nodes from dogs naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi*. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 8, p. 610-616, 2009.

KOUTINAS, A.F. *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 35, p. 376–383, 1999.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LIMA, WG. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Trop.**, v. 92, p. 43–53, 2004.

LIMA, I. *et al.* Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLOS One**, v. 9 p. 87742, 2014.

MACLENNAN, C. *et al.* The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. **Immunol. Rev.**, v. 156, p. 53-66, 1997.

MADEIRA, F. *et al.* Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 5, p. 442-425, 2006.

MAIA-ELKHOURY, N. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saude Publ.**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MALLA, N; MAHAJAN, R.C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recent concepts. **Ind. J. Med. Res.**, v. 123 p. 267-274, 2006.

MANCIANTI, F. *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 82, p. 566–567, 1998.

MARTINEZ-MORENO, A. *et al.* Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 48 p. 209-220, 1995.

MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. **The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals**. 4. John St, London: Taylor & Francis, Ltd, 1983.

MOREIRA, M. A. *et al.* Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol.**, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007.

MOREIRA, R. *et al.* Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral *leishmania*. **Parasitol. Res.**, v. 107, p. 605–613, 2010.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat. Rev. Immunol.** v. 5 p. 606-616, 2005.

MUELLER, S. N.; AHMED, R. Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. **Immunol. Rev.**, v. 224 p. 284-294, 2008.

MURRAY, H.W. *et al.* Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561–1577. (ANO)

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

NUNES, C. M. *et al.* Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 153, n. 1-2, p. 19-23, 2008.

OHL, L.; BERNHARDT, G.; PABST, O. *et al.* Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs **Semin. Immunol.**, v. 15 p. 249-255, 2003.

OKADA T., M.J. *et al.* Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. **PLoS Biol.**, v. 3, p. e150, 2005.

OMS. Leishmanioses. **OMS**, 2016.

OMS. Leishmanioses. **OMS**, 2017.

PAPE K.A., *et al.* Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 1677-1687, 2003.

POCAI, E.A., *et al.* Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciê. Rural**, v 28, n.3, p 501-505,1998.

REALE, S. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **J. Clin.**, v. 37, p. 2931, 1999.

REIS, A.B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.**, v. 81, p. 68–75, 2006.

REIS, A.B. *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, p. 87-95, 2009.

REIS, A. B. *et al.* Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitol.**, v. 26, p. 341–349, 2010.

REIF K., E.H, *et al.* Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. **Nature**, v. 416, p. 94-99, 2002.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania* – Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 292-297, 2000.

SMELT SC, *et al.* Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 158, p. 3813–3821, 1997.

SANTANA, C. C. *et al.* Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs **Parasite Immunol.** v. 30 p. 515-524, 2008.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clín. Vet.**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Vet. Dermatol.**, v. 20, n. 5-6, p. 471-489, Oct 2009.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. *et al.* Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 73, p. 82–86, 2005.

SIDERIS, V. *et al.* Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. **Eur. J. Epidemiol.** 15, 271–276, 1999.

SILVA, J. *et al.* Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis **PLoS One**, v. 7 p.e 29103, 2012.

SILVA-O'HARE J. *et al.* Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: changes in homing and survival of plasma cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0156733, 2016.

SINAN/SVS/MS. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil. Grandes Regiões e Unidades Federadas**, 1990 a 2015. 2017.

SIXT M. *et al.* The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node **Immunity**, v. 22, p. 19-29, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Canine leishmaniosis—a challenging zoonosis. **Eur. J. Comp. Anim. Pract.**, v. 18, p. 232–241, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis **Vet. Parasitol.**, p. 165, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 86, 2011.

TAFURI, W. L. *et al.* An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J. Immunol. Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

SOLCÀ, M. *et al.* Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 184, p. 133–140, 2012.

VASCONCELOS, T.C.B. *et al.* Cytokine and iNOS profiles in lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and their association with the parasitic DNA load and clinical and histopathological features **Vet. Parasitol.**, v. 227, p. 8-14, 2016.

VERESS, B. *et al.* Visceral spreading depletion of thymus-dependent regions and amyloidosis in mice and hamsters infected intradermally with *Leishmania* isolated from Sudanese cutaneous leishmaniasis. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 64, n. 5, p. 505-514, 1983.

VERESS, B. *et al.* Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, n. 5, p. 605-610, 1977.

VIADANNA, P. H. O. *et al.* Relationship between blood-borne parameters and gross lesions in *leishmania chagasi* seroreagents dogs. **Braz. J. Vet. Pathol.**, v. 4, n. 3, p. 207-213, 2011.

VON ANDRIAN, T.R. Mempel Homing and cellular traffic in lymph nodes. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 867-878, 2003.

VINUESA, C.G. *et al.* Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 853-865, 2005.

YOUNG D. G.; DUNCAN M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem. Amer. Entomol. Inst.**, v. 54, p. 1-881. 1994.

ZER, R. *et al.* Effect of sand fly saliva on Leishmania uptake by murine macrophages. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 810-814, 2011.

## 9. Apêndices

**Tabela 6.** Alterações histopatológicas em cães com infecção ativa e não ativa por *Leishmania infantum* e grupo controle.

Parâmetros	Infecção Ativa (n=18)	Infecção Não Ativa (n=15)	Controle (n=5)
<b>Presença do infiltrado celular na cápsula</b>			
Ausente	0	1 (7%)	1 (20%)
Neutrófilo	0	4 (26%)	0
Plasmócito	9 (50%)	8 (53%)	0
Linfócito	0	1 (7%)	1 (20%)
Misto	9 (50%)	1 (7%)	3 (60%)
<b>Intensidade do infiltrado celular na cápsula</b>			
Discreto	9 (50%)	8 (53%)	3 (75%)
Moderado	5 (28%)	5 (33%)	1 (25%)
Intenso	4 (22%)	1 (7%)	0
<b>Distribuição do infiltrado celular na cápsula <sup>a</sup></b>			
Focal	1 (5%)	5 (33%)	3 (75%)
Multifocal	9 (50%)	8 (53%)	0
Difuso	8 (45%)	1 (7%)	1 (25%)
<b>Presença do infiltrado celular nos cordões medulares</b>			
Ausente	3 (16%)	2 (14%)	0
Neutrófilo	0	1 (7%)	0
Plasmócito	13 (72%)	11 (73%)	5 (100%)
Linfócito	1 (5%)	0	0
Misto	1 (5%)	1 (7%)	0
<b>Intensidade do infiltrado nos cordões medulares</b>			
Discreto	1 (7%)	2 (13%)	3 (60%)
Moderado	14 (93%)	7 (47%)	1 (20%)
Intenso	0	5 (33%)	1 (20%)
<b>Distribuição do infiltrado nos cordões medulares</b>			
Focal	1 (6%)	0	0
Multifocal	7 (47%)	6 (40%)	4 (80%)
Difuso	7 (47%)	8 (53%)	1 (20%)
<b>Intensidade da histiocitose</b>			
Ausente	3 (16,6%)	6 (40%)	1 (20%)
Discreta	3 (16,6%)	7 (47%)	4 (80%)
Moderada	3 (16,6%)	2 (13%)	0
Intensa	9 (50%)	0	0
<b>Distribuição da histiocitose</b>			
Ausente	3 (17%)	6 (40%)	1 (20%)
Focal	2 (11%)	5 (33%)	0
Multifocal	6 (33%)	3 (20%)	2 (40%)
Difusa	7 (39%)	1 (7%)	2 (40%)

<sup>a</sup>p = 0,0203



**Tabela 7** Alterações histopatológicas em linfonodos de cães com infecção ativa por *Leishmania infantum* associada a organização da polpa branca esplênica.

Parâmetros	Infecção Ativa (n=18)	
	Baço TIPO 1 n=9 (%)	Baço TIPO 3 n=9 (%)
<b>Constituinte do infiltrado capsular</b>		
Plasmócito	4 (44%)	5 (56%)
Misto	5 (56%)	4 (44%)
<b>Intensidade do infiltrado capsular</b>		
Discreto	4 (44%)	5 (56%)
Moderado	3 (33%)	2 (22%)
Intenso	2 (22%)	2 (22%)
<b>Distribuição do infiltrado capsular</b>		
Focal	1 (11%)	1 (11%)
Multifocal	5 (56%)	5 (56%)
Difuso	3 (33%)	3 (33%)
<b>Constituinte do infiltrado celular nos cordões medulares</b>		
Ausente	0	2 (22%)
Linfócito	0	1 (11%)
Neutrófilo	0	0
Plasmócito	4 (44%)	6 (67%)
Misto	5 (56%)	0
<b>Intensidade do infiltrado nos cordões medulares</b>		
Ausente	0	1 (11%)
Discreto	1 (11%)	1 (11%)
Moderado	5 (55%)	6 (67%)
Intenso	3 (33%)	1 (11%)
<b>Distribuição do infiltrado nos cordões medulares</b>		
Focal	0	0
Multifocal	5 (56%)	1 (11%)
Difuso	4 (44%)	4 (45%)
<b>Granulomas</b>		
Presente	0	1 (11%)
Ausente	9 (100%)	8 (89%)
<b>Intensidade da plasmocitose</b>		
Ausente	0	3 (33%)
Discreto	3 (33%)	0
Moderado	1 (11%)	4 (45%)
Intenso	5 (56%)	2 (22%)
<b>Intensidade da histiocitose</b>		
Ausente	0	3 (33%)
Discreto	3 (33%)	0
Moderado	0	3 (33%)
Intenso	6 (67%)	3 (33%)

Parâmetros	Infecção Ativa (n=18)	
	Baço TIPO 1 N=9 (%)	Baço TIPO 3 N=9 (%)
<b><i>Distribuição da Histiocitose</i></b>		
Focal	2 (22%)	0
Multifocal	4 (45%)	2 (22%)
Difusa	3 (33%)	4 (45%)
<b><i>Hemossiderina</i></b>		
Presente	1 (11%)	1 (11%)
Ausente	8 (89%)	8 (89%)
<b><i>Formas Amastigotas</i></b>		
Presente	2 (23%)	0
Ausente	7 (77%)	9 (100%)

**Tabela 8.** Alterações histopatológicas em linfonodos de cães com infecção não ativa por *Leishmania*

Parâmetros	Infecção não ativa n=15	
	Baço TIPO 1 n=9 (%)	Baço TIPO 3 n=6 (%)
<b>Constituinte do infiltrado capsular</b>		
Ausente	0	1 (17%)
Neutrófilo	1 (11%)	3 (50%)
Plasmócito	6 (67%)	2 (33%)
Linfócito	1 (11%)	0
Misto	1(11%)	0
<b>Intensidade do infiltrado capsular</b>		
Ausente	0	1 (17%)
Discreto	4 (45%)	4 (67%)
Moderado	5 (55%)	0
Intenso	0	1 (17%)
<b>Distribuição do infiltrado capsular</b>		
Focal	2 (22%)	3 (50%)
Multifocal	7 (78%)	1 (17%)
Difuso	0	1 (17%)
<b>Constituinte do infiltrado celular nos cordões</b>		
Ausente	0	1 (17%)
Neutrófilo	1 (11%)	0
Plasmócito	7 (78%)	4 (66%)
Linfócito	0	1 (17%)
Misto	1 (11%)	0
<b>Intensidade do infiltrado nos cordões</b>		
Ausente	0	1 (17%)
Discreto	1 (11%)	1 (17%)
Moderado	5 (56%)	2 (33%)
Intenso	3 (33%)	2 (33%)
<b>Distribuição do infiltrado nos cordões</b>		
Focal	0	1 (17%)
Multifocal	5 (56%)	4 (66%)
Difuso	4 (44%)	1 (17%)
<b>Granulomas</b>		
Presente	2 (22%)	6 (100%)
Ausente	7 (77%)	0
<b>Intensidade da plasmocitose</b>		
Ausente	0	0
Discreto	3 (33%)	0
Moderado	1 (11%)	4 (66%)
Intenso	5 (56%)	2 (33%)
<b>Intensidade da histiocitose</b>		
Ausente	6 (67%)	0
Discreto	2 (22%)	5 (90%)
Moderado	1 (11%)	1 (10%)
Intenso	0	0

**Distribuição da histiocitose**

Ausente	6 (67%)	1 (17%)
Focal	1 (11%)	1 (17%)
Multifocal	2 (22%)	2 (33%)
Difusa	0	3 (50%)

**Hemossiderina**

Presente	1 (11%)	5 (83%)
Ausente	8 (89%)	1 (17%)

**Formas amastigotas**

Presente	2 (22%)	0
Ausente	7 (78%)	6 (100%)

---

**Tabela 9.** Exames hematológicos e bioquímicos de cães com infecção ativa e não ativa para *Leishmania infantum* levando em consideração a desorganização da polpa branca esplênica

Parâmetro	Infecção ativa		Infecção não ativa		Valores de referência
	n= 4		n= 2		
	Baço tipo 1 n= 1	Baço tipo 3 n= 3	Baço tipo 1 -	Baço tipo 3 n= 2	
Hemácias	6,56	2,73 2,66 5,3		4,44 4,84	(5.500.000 - 8.500.000)
Hemoglobina	14,3	6,6 5,7 11,5		10,9 10,7	(12,0 - 18,0)
Hematócrito	42,3	18,2 14,9 34,3		29,9 31,2	(37- 55)
Leucócitos	18,2	16,2 13,7 55,3		29,2 20,3	(6.000 - 17.000)
Plaquetas	161.000	155.000 131.000 369.000		79.000 232.000	(166.000 - 540.000)
Proteínas Totais	14	16 8,6 7,6		13 15	(6.0 - 8.0)
Albumina	4,8	- 2 2,4		2,6 3	(2,6 - 3,3)
Uréia	48	- 46 41		45 32	(21,4 - 59,92)
Creatina	11	- 0,53 0,78		0,95 0,82	(0,5 - 1,5)
AST	25	120 57 28		37 31	(10 - 88)
ALT	37	72 54 35		37 43	(10 - 88)

Parâmetro	Infecção ativa		Infecção não ativa		Valores de referência
	n=4		n=2		
	Baço Tipo 1 n=1	Baço Tipo 3 n=3	Baço Tipo 1 -	Baço Tipo 3 n= 2	
Colesterol	218	448	-	182	(100 - 275)
		238		180	
		102			
HDL	186	-	-	136	(33 - 120)
		131		186	
		83			
Triglicérides	85	83	-	46	(15 - 380)
		39		85	
		40			

**IGM**

**YURI DE JESUS SILVA**

**Caracterização morfológica das alterações dos linfonodos  
Associadas às formas graves da Leishmaniose Visceral Canina**

**2019**