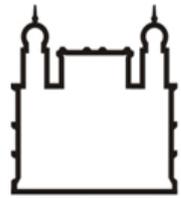




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Pós-graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL NATURALMENTE INFECTADOS DO MUNICÍPIO DE JEQUIÉ-BA
(BRASIL)**

NANCI DEREVTSOFF MUNFORD

**Salvador– Bahia – Brasil
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Pós-graduação em Patologia

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL NATURALMENTE INFECTADOS DO MUNICÍPIO DE JEQUIÉ-BA
(BRASIL)**

NANCI DEREVTSOFF MUNFORD

Orientador: Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Patologia Experimental como
requisito para a obtenção do
Grau de Mestre.

Salvador– Bahia – Brasil
2016

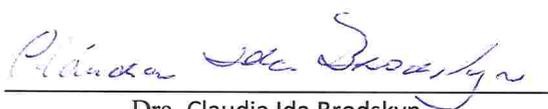
**“ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL NATURALMENTE
INFECTADOS DO MUNICÍPIO DE JEQUIÉ-BA(BRASIL)”**

NANCI DEREVTSOFF MUNFORD

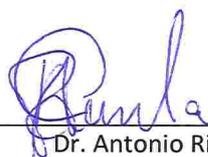
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 20 de junho de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Claudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Titular
FIOCRUZ



Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha
Pesquisador
FIOCRUZ



Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas
Pesquisador Titular
FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir ter desenvolvido esse trabalho, e que por mais que a tarefa parecesse árdua, trouxe grandes ensinamentos em todos os âmbitos, desde o começo.

A toda minha família, especialmente a minha mãe, Catarina Munford Derevtsoff e meu esposo, Jacson Farias pelas palavras de conforto, amor e pela força nas horas em que mais precisava.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, pela paciência infinda, pelo incentivo a melhoras acadêmicas e principalmente pelos aprendizados que vou levar para o resto da vida.

À Dra. Débora Mothé Fraga, Dr. Washington Conrado e Dra. Conceição Almeida pela disponibilidade e contribuições.

À Marta, Joane e Isadora pelo aprendizado na técnica de imunistoquímica e busca dos materiais.

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Biointervenção e aos colegas de curso, especialmente Alana e Leila, que sempre se mostraram solícitos e ajudaram no que fosse necessário.

Aos funcionários da biblioteca e, em especial, a Sra. Ana Maria Fiscina, pelo apoio e contribuições.

Às pessoas que trabalham na Fiocruz, que sempre de alguma forma estavam auxiliando a pesquisa.

À Fundação Oswaldo Cruz e ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz pela estrutura física para realização dos trabalhos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido pela bolsa de mestrado.

Munford, N.D. Alterações histopatológicas em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados do município de Jequié-Ba (Brasil). Salvador, 2016. 93 f. il. (Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Leishmaniose visceral é uma zoonose grave que acomete uma gama de animais. O cão é considerado o principal reservatório urbano da *Leishmania infantum* e pode ser clinicamente assintomático ou sintomático na infecção. Poucos estudos abordam os aspectos clínicos e histopatológicos na leishmaniose visceral, sobretudo estudos sistemáticos, que fazem descrição detalhada dos achados de histopatologia e façam a correlação desses aspectos na doença. A hipótese da pesquisa é que cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentam alterações histopatológicas distintas que se relacionam com as manifestações clínicas, tendo significados diagnóstico e prognóstico. **OBJETIVO:** O objetivo do trabalho foi a descrição sistemática das alterações histopatológicas encontradas nos diversos órgãos de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados, correlacionando com diferentes manifestações clínicas. **MÉTODOS:** Para este estudo foram coletados amostras e dados provenientes de 58 cães do município de Jequié-Ba, área endêmica para leishmaniose. Os cães foram submetidos a exame clínico, eutanásia e coleta de material para PCR, ELISA e cultura, além de fragmentos de fígado, baço, linfonodo, pele, intestino, rins e pulmões. Os animais foram classificados em assintomáticos, quando apresentaram até dois sinais, e sintomáticos, quando exibiram mais de dois sinais. Cães com positividade simultânea nos testes de cultura esplênica, ELISA e PCR tiveram cortes dos tecidos submetidos a procedimento imunoistoquímico para avaliação da carga parasitária em linfonodo, baço e fígado. Lâminas dos fragmentos obtidos foram avaliadas sob microscopia óptica para análise das alterações. **RESULTADOS:** Ao todo, nove animais foram classificados como assintomáticos e 49 sintomáticos. Os 58 cães da pesquisa foram positivos em pelo menos um dos testes realizados para diagnóstico da infecção: PCR (n=91,38%), ELISA (n= 84,48%) ou cultura esplênica (n= 34,48%). No fígado, a linfocitose intrassinusoidal moderada se mostrou mais frequente no grupo dos sintomáticos (p=0,008). Nos demais parâmetros hepáticos, os grupos não obtiveram diferenças estatisticamente significantes. No baço, linfonodo, intestino, pele, rins e pulmões, as alterações se comportaram de forma semelhante entre as manifestações clínicas. A maior carga parasitária foi encontrada no baço. **CONCLUSÃO:** As alterações histopatológicas não mostraram diferenças entre as manifestações clínicas.

Palavras chave: Leishmaniose visceral canina, manifestação clínica, histopatologia, órgãos.

Munford, N. D. Histopathological changes in dogs with visceral leishmaniasis naturally infected in the city of Jequié-Ba (Brazil) Salvador, 2016. 93 f. il. (Master thesis in Experimental Pathology) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Goncalo Moniz, Salvador.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis is a serious zoonosis that affects a range of animals. The dog is considered the main urban reservoir of *Leishmania infantum* and may be clinically asymptomatic or symptomatic in infection. Few studies address the clinical and histopathological aspects in visceral leishmaniasis, especially systematic studies, which are detailed description of histopathology findings and making the correlation of these aspects of the disease. The hypothesis of the research is that dogs naturally infected with *L. infantum* have distinct histopathologic changes that relate to the clinical manifestations, diagnosis and prognosis. **OBJECTIVE:** The objective was the systematic description of histopathology found in the various organs of dogs with visceral leishmaniasis naturally infected, correlated with different clinical manifestations. **METHODS:** For this study were collected samples and data from 58 dogs in the city of Jequié-Ba, endemic area for leishmaniasis. The dogs underwent clinical examination, euthanasia and collection of material for PCR, ELISA and culture, as well as fragments of liver, spleen, lymph nodes, skin, intestine, kidneys and lungs. The animals were classified as asymptomatic when presented two signs, and symptomatic when exhibited more than two signals. Dogs with positive symptomatology for splenic culture, ELISA and PCR were subjected to cuts tissue immunohistochemical procedure for evaluating the parasite load in the lymph node, spleen and liver. Blades fragments obtained were evaluated by optical microscopy for analysis of changes. **RESULTS:** In all, nine animals were classified as asymptomatic and 49 symptomatic. The 58 dogs of the survey were positive in one of the tests for the diagnosis of infection: PCR (n = 91.38%), ELISA (n = 84.48%) or splenic culture (n = 34.48%). In the liver, moderate sinusoidal intra lymphocytosis was more frequent in the symptomatic group (p = 0.008). In other hepatic parameters, the groups no revealed statistically significant differences. In spleen, lymph nodes, intestines, skin, kidneys and lungs, the changes are similarly between the clinical manifestations. The largest parasitic load was found in the spleen. **CONCLUSION:** The histopathological changes showed no differences between the clinical manifestations.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis, Clinical Manifestations, Histopathology, Organs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Frequências no critério de intensidade de inflamação nos grupos em espaço porta nos cães naturalmente infectados.	42
Figura 2	Frequências no critério de intensidade de inflamação perivenular central nos grupos nos cães naturalmente infectados.	43
Figura 3	Fotomicrografia de tecido hepático dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Inflamação portal linfoplasmocitária discreta (HE, aumento de 200x) (B) Hiperplasia e hipertrofia de Kupffer (HE, aumento de 400x).	48
Figura 4	Fotomicrografia de tecido hepático dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Linfocitose intrassinusoidal (HE, aumento de 200x) (B) Granuloma portal (HE, aumento de 200x).	49
Figura 5	Frequências dos tipos de folículos esplênicos nas manifestações clínicas, segundo os mesmos critérios adotados por Santana et al, 2008.	50
Figura 6	Grau de organização dos folículos linfoides do baço (A) Folículos tipo 1 ou bem organizado (B) Folículos tipo 2 ou levemente desorganizados (C) Folículos do tipo 3 ou tecido linfoide desorganizado.	50
Figura 7	Frequência de intensidade da plasmocitose registrada nos cordões esplênicos nos grupos dos cães naturalmente infectados.	57
Figura 8	Fotomicrografias do baço dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Plasmocitose em cordões esplênicos (HE, aumento de 400x) (B) Periesplenite (HE, aumento de 200x).	53
Figura 9	Frequência das Intensidades de plasmocitose em linfonodos nos grupos dos cães naturalmente de área endêmica do município de Jequié-Ba.	57
Figura 10	Fotomicrografias de linfonodo dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Espessamento em cordões (HE, aumento de 100x) (B) Plasmocitose em cordões (HE, aumento de 400x).	58
Figura 11	Fotomicrografias de linfonodo dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Hiperplasia de folículos (HE, aumento de 100x) (B) Dilatação dos seios medulares (HE, aumento de 200x).	58

Figura 12	Fotomicrografia da pele de cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Infiltrado inflamatório discreto perianexial (HE, aumento de 200x) (B) Infiltrado linfoplasmocitário perianexial discreto (HE, aumento de 400x).	61
Figura 13	Intensidade do infiltrado peribronquiolar registrado nos casos em assintomáticos e sintomáticos.	64
Figura 14	Fotomicrografia dos pulmões de cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Infiltrado peribronquiolar discreto, alvéolos com características normais (HE, aumento 100x) (B) infiltrado peribronquiolar discreto (HE, aumento 200x).	65
Figura 15	Fotomicrografia dos rins dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Infiltrado no interstício renal (HE, aumento de 100x). (B) Infiltrado linfoplasmocitário presente no interstício (HE, aumento de 400x).	71
Figura 16	Fotomicrografia dos rins dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Glomerulonefrite membranoproliferativa (B) Glomerulonefrite proliferativa (HE, aumentos de 400x).	71
Figura 17	Fotomicrografia de marcação por imunistoquímica em cão naturalmente infectado do município de Jequié-Ba. (A, B) Fragmentos hepáticos revelando numerosos parasitos. (Aumento 400x).	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caraterísticas gerais e em diferentes manifestações clínicas da população de cães infectados por <i>Leishmania sp.</i> do município de Jequié-Ba.	40
Tabela 2	Tipo de infiltrados encontrados e intensidade de inflamação registradas em espaços porta e perivenular central nos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba.	43
Tabela 3	Dados obtidos nos critérios das análises de hiperplasia e hipertrofia de Kupffer e linfocitose intrassinusoidal nos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba.	45
Tabela 4	Frequências obtidas nos parâmetros localização, intensidade e tamanho dos granulomas dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba.	46
Tabela 5	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros balonização, esteatose e positividade de parasitismo em HE nas amostras dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	47
Tabela 6	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo de folículos, plasmocitose, presença de megacariócitos, tipo de infiltrado e intensidade da periesplenite nas amostras dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	52
Tabela 7	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo de infiltrado e intensidade de capsulite e hiperplasia de folículos nas amostras dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	54
Tabela 8	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros dilatação do seio subcapsular e medular nas amostras de linfonodo dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	55
Tabela 9	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros histiocitose dos seios subcapsular e medular nas amostras de linfonodo dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	56
Tabela 10	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros plasmocitose e espessamento de cordões nas amostras de linfonodo dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	57
Tabela 11	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo de infiltrado, intensidade, distribuição e localização preferencial da inflamação da derme nas amostras dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	60

Tabela 12	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo e intensidade de infiltrado encontrado na mucosa, plasmocitose e presença de amastigotas de <i>Leishmania</i> nas amostras de intestinos dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	62
Tabela 13	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo e intensidade do infiltrado peribronquiolar nas amostras de pulmão dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	65
Tabela 14	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros broncopneumonia, edema e hemorragia nas amostras de pulmão dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	66
Tabela 15	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo, intensidade, distribuição e concentração periglomerular de infiltrado de nefrite intersticial e tipos de glomerulonefrite verificados nas amostras de rins dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	68
Tabela 16	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo e intensidade do infiltrado na pelve nas amostras de rins dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	69
Tabela 17	Frequências obtidas nas análises dos parâmetros intensidades de vacuolização e pigmentos em células tubulares de células tubulares e cilindros hialinos nas amostras de rins dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
Ct	Ciclo limiar (do inglês <i>threshold cycle</i>)
ELISA	Ensaio imuno enzimático (do inglês <i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
FA	Fosfatase alcalina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GGT	Gama glutamiltransferase
IFN γ	Interferon gama (Citocina)
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação da cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	Reação da cadeia da polimerase quantitativa (do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal (do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumoral necrosis factor</i>)
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês <i>T helper-1</i>)
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2 (do inglês <i>T helper-2</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
Kg	Kilograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
mg	Miligrama
ng	Nanograma

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL	14
1.2	LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL	15
1.3	SINTOMATOLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	17
1.4	HISTOPATOLOGIA NA LEISHMANIOSE	19
1.4.1	Histopatologia no fígado, baço, linfonodo e pele	19
1.4.2	Histopatologia no intestino, rins e pulmões	23
2	JUSTIFICATIVA	28
3.	OBJETIVOS	29
3.1	GERAL	29
3.2	ESPECÍFICOS	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	OS ANIMAIS E PROCEDIMENTOS PRÉVIOS	30
4.1.1	Exame clínico dos animais	31
4.1.2	ELISA	32
4.1.3	Cultura	33
4.1.4	PCR	33
4.2	COLHEITA, FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO	35
4.3	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	35
4.4	PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO	37
4.5	AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA	38
4.6	ANÁLISE E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	38
5	RESULTADOS	39
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	39
5.2	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA NOS CÃES INFECTADOS COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS	41
5.2.1	Fígado	41
5.2.2	Baço	49
5.2.3	Linfonodo	53
5.2.4	Pele	59
5.2.5	Intestino	61
5.2.6	Pulmões	62
5.2.7	Rins	66
5.3	IMUNOISTOQUÍMICA E CARGA PARASITÁRIA	72
5.3.1	Fígado	72
5.3.2	Baço	72
5.3.3	Linfonodo	73
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa crônica, sistêmica, antroponótica ou zoonótica a depender da região e do agente envolvido, e que leva a óbito milhares de pessoas anualmente. No cenário atual, são notificados casos de LV em 65 países nos continentes europeu, asiático, africano e americano (DESJEUX, 2004).

Albânia, Espanha, Itália, Iraque, China, Geórgia, Somália, Uganda, Quênia, Argentina, Colômbia, México e Paraguai são apenas alguns dos países que estão na lista onde a enfermidade está presente. Aproximadamente 90% dos casos de LV estão concentrados na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (ALVAR *et al.*, 2012).

Em território brasileiro, em 2013, foram registrados 3.253 casos humanos confirmados da doença em 21 unidades da federação, distribuídos nas cinco regiões do país, com maior número no nordeste. Nessa região foram relatados cerca de 1.745 pacientes. O Estado do Maranhão, seguido do Ceará e da Bahia lideram as ocorrências. Neste último estado, no mesmo período, foram computados 276 indivíduos portadores (SINAN/SVS/MS, 2014). Entre as localidades da Bahia com episódios de LV encontram-se Juazeiro, Iraquara, Guanambi, Salinas da Margarida, Irecê (BRASIL, 2011), Feira de Santana, Camaçari e Jequié, dentre várias outras, totalizando 43,2% dos municípios do estado (SUVISA/DIVEP, 2013). Dados recentes demonstram transmissão autóctone em 1.600 cidades do Brasil (BRASIL, 2006).

A Leishmaniose Visceral (LV) presente em nosso país tem caráter zoonótico e vem se expandindo numérica e territorialmente. Em sua gênese foi caracterizada como uma doença rural, que progrediu para regiões litorâneas e da periferia urbana e já é evidenciada em várias cidades de maior porte do Brasil (COSTA, PEREIRA e

ARAÚJO, 1990; COSTA, 1995; BEVILACQUA *et al.*, 2001; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; FURLAN, 2010), fato também descrito em outros países (CAMPINO e MAIA, 2010). Acomete além do homem, uma gama de animais domésticos, incluindo cães, gatos e cavalos (ROLÃO *et al.*, 2005; MAROLI *et al.*, 2007; CHATZIS *et al.*, 2014; PENNISI, 2015) e animais silvestres, livres ou em cativeiro (DINIZ *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010; ROQUE e JANSEN, 2014; SOUZA *et al.*, 2014).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

O agente envolvido na LV é um parasito tripassonomatídeo, da ordem *Kinetoplastida*, do gênero *Leishmania* (NEVES, 2006). No Brasil é causada pela espécie *L. infantum* (BRASIL, 2006), hoje considerada como a mesma espécie de *Leishmania chagasi*, representando um sinônimo (MAURICIO *et al.*, 1999; FRAGA *et al.*, 2010; ROMERO e BOELAERT, 2010).

São conhecidos como meios de transmissão em cães, a via venérea, transplacentária (ROSYPAL *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; BOGGIATTO *et al.*, 2011; NAUCKE e LORENTZ, 2012) e sobretudo através de vetores biológicos. Em território brasileiro, são referidas como transmissoras, fêmeas de flebotomíneos das espécies *Lutzomyia longipalpis* (*L. longipalpis*) (MONTEIRO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2014), já reconhecida como principal vetor, e mais recentemente sugerida a participação de outros membros do gênero, tais como *Lutzomyia lenti* (SHERLOCK, 1996), *Lutzomyia cruzi* (MISSAWA *et al.*, 2011) e *Lutzomyia migonei* (SILVA *et al.*, 2014).

As fontes em potencial, e fontes reconhecidas de infecção por *L. infantum* para os flebotomíneos, são mamíferos pertencentes a ordens Didelphimorphia, Pilosa, Rodentia, Carnivora, Primata e Chiroptera (ROQUE e JANSEN, 2014). Didelfídeos como *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* (BRASIL, 2006; CARREIRA *et al.*, 2012); felídeos como pumas (*Puma concolor*), jaguares (*Panthera onca*) (DAHROUG *et al.*, 2010) e gatos domésticos (*Felis domesticus*) (MAROLI *et al.*, 2007); e canídeos como raposas (*Lycalopex vetulus*), lobo-guará (*Chrysocyon*

brachyurus) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) (LUPPI *et al.*, 2008), são espécies capazes de atuarem como reservatórios.

Além das espécies já citadas, humanos e cães compõem fontes de alimentação para o inseto, contribuindo para perpetuação da doença em meio urbano, porém os cães constituem a principal fonte de infecção no domicílio e peridomicílio devido ao seu alto parasitismo cutâneo (SHERLOCK, 1996; DIAS, LOROSA e REBÊLO, 2003; COSTA, 2013). Humanos com residências que possuem cães têm mais chances de contraírem LV do que os domicílios que não os contém, risco que aumenta quando há mais de um cão (BORGES *et al.*, 2009). O papel do cão como principal reservatório urbano parece bem consolidado, caso reafirmado por estudos que indicam que epidemias de LVC precedem surtos de casos humanos (BEVILACQUA *et al.*, 2001).

Pela principal via de transmissão, o ciclo da LV é heteroxênico, contando com a participação de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. Fêmeas dos vetores ingerem formas amastigotas ao praticarem hematofagia em mamíferos que albergam o parasito contido em macrófagos da derme. Em etapa posterior, no tubo digestivo dos flebotomíneos, ocorrem divisões binárias, seguidas de um processo de diferenciação, após 24 a 48 horas da ingestão, as formas amastigotas, que são aflageladas, encontram-se sob formas flageladas denominadas promastigotas. As promastigotas, por sua vez, continuam o processo de proliferação e diferenciam-se na sequência em paramastigotas e após em promastigotas metacíclicas, forma infectante do parasito. O parasito realiza a colonização do trato digestivo do inseto que, durante o repasto sanguíneo inocula o agente no hospedeiro vertebrado. A partir daí, macrófagos fagocitam as formas flageladas que se fundem a lisossomos dando origem ao vacúolo parasitóforo. Já transformadas em amastigotas, há replicação com lise celular levando a infecção de novos fagócitos mononucleares (NEVES, 2006; DINIZ *et al.*, 2008).

A LVC apresenta curso lento, insidioso, com período de incubação médio em cães, entre três e sete meses, podendo se estender por vários anos ou em certo percentual nunca vir a exibir o quadro clínico da doença. É caracterizada por polimorfismo clínico com indivíduos apresentando desde nenhum sinal a inúmeros sinais da doença (BRASIL, 2014).

1.3 SINTOMATOLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A sintomatologia da leishmaniose visceral é diversa, muitas vezes é inespecífica e presente em outras doenças do cão, tanto no acometimento primário pela LVC, quanto em infecções oportunistas, o que dificulta o diagnóstico (SILVA et al., 2007).

Em pacientes humanos são relatados sinais como aumento de volume e dor abdominal, hepatomegalia, esplenomegalia, astenia, febre ondulatória, tosse, diarreia, perda de peso, caquexia, edema, icterícia, manifestações hemorrágicas, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, (PASTORINO et al, 2002; DESJAUX, 2004; GONTIJO e MELO, 2004) . Nos cães sintomáticos, alterações clínicas incluem membranas mucosas pálidas, ceratoconjuntivite, esplenomegalia, linfadenopatia, que acontece de forma simétrica ou generalizada, hipertermia, redução do apetite, emagrecimento, caquexia, problemas cutâneos como dermatite esfoliativa seca, alopecia periorbital ou generalizada, onicogribose, cicatrizes, e ainda lesões de pele especialmente em focinho e orelhas (CIARAMELLA et al, 1997; SANT'ANA et al, 2007; MELO et al, 2008; FIGUEIREDO et al, 2014), além de icterícia, vômito (POCAI et al, 1998) e uveíte (PARADIES et al, 2010). Achados laboratoriais na LVC são descritos como anemia, trombocitopenia, hiperproteinemia com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, elevação da fosfatase alcalina (FA), hematúria e proteinúria (POCAI et al, 1998; RALLIS et al, 2005; ADAMAMA-MORAITOU et al, 2007).

Cães e humanos compartilham uma gama de sinais da enfermidade, fazendo com que a doença no cão se assemelhe bastante a doença humana, excetuando o quadro cutâneo e o emagrecimento, tornando o cão um bom modelo para estudo da LV, facilitando assim a compreensão da progressão da enfermidade (MORENO e ALVAR, 2002).

A forma assintomática da LVC, no Brasil, representa entre 40 a 60% da população de soropositivos (BRASIL, 2014). A manifestação ou não de sinais de sinais no cão, relacionados à enfermidade, é dependente fatores genéticos e do tipo de resposta imune montada frente à infecção com conseqüente controle da carga

parasitária (BANETH et al, 2008). Sabe-se que respostas baseadas essencialmente em perfil celular conferem ao indivíduo resistência a doença, enquanto as com perfil humoral estão envolvidas na progressão da enfermidade (PINELLI et al.,1994).

Em animais susceptíveis é relatada a ausência de hipersensibilidade retardada a antígenos de *Leishmania*, decréscimo de linfócitos T, assim como a falta de produção de Interferon gama (IFN- γ) e Interleucina 2 (IL-2) por células sangue periférico além de altos títulos de anticorpos, não capazes de neutralizar a infecção. Nos indivíduos assintomáticos, de forma distinta ao que se processa nos sintomáticos, há a ativação de linfócitos T CD4+ com predomínio de resposta do tipo Th1 que produzem TNF- α , IL-2 e INF- γ , que por meio da ativação de macrófagos e produção de óxido nítrico são responsáveis pela eliminação das formas amastigotas (ALVAR et al., 2004; BARBIÉRE, 2006).

Há escassez de pesquisas que avaliam o papel de outras citocinas para entendimento mais aprofundado sobre os perfis de resposta a LV, sobretudo no cão. Observações apontam a IL-12 como responsável pela elevação da produção de INF- γ enquanto a IL-10 faria o papel oposto, estando assim envolvidas maiores níveis de IL-12 com resolução e IL-10 com quadros progressivos da doença (BACELLAR et al., 2000; BANETH et al., 2008). A IL-18 foi encontrada conjuntamente com INF- γ e IL-2, em uma avaliação de cães naturalmente infectados que permaneceram prolongadamente sem sinais da doença (MANNA et al, 2006).

Nos estudos realizados em cães, não é visto uma dicotomia clara nos perfis de respostas, porém sabe-se que o perfil Th1 determina resolução do quadro, enquanto a doença está associada um misto de resposta Th1 e Th2, cujo equilíbrio entre elas e suas tendências, determinarão o curso da enfermidade (BANETH et al, 2008).

Além da análise dos marcadores de suscetibilidade e resistência anteriormente discorridos, é proposto como indicador apropriado da condição clínica dos animais o níveis totais de imunoglobulinas IgG específicas e seus isotipos IgG1 e IgG2. (BARBIÉRE, 2006). Em suas pesquisas, Reis et al. (2006) encontraram maiores níveis de IgG1 em animais aparentemente saudáveis, enquanto IGg2, conjuntamente com outras imunoglobulinas, estava presente em maior quantidade

em indivíduos sintomáticos e que exibiam maior carga parasitária em linfonodo, baço, medula óssea e na pele.

A relação entre carga parasitária, manifestação clínica e lesões histopatológicas produzidas na doença vem sendo alvo de análise em alguns estudos. Os resultados são controversos, havendo correlação variável, dependente do órgão ou ainda no mesmo órgão (LIMA et al, 2004; RALLIS et al, 2005; GIUNCHETTI et al., 2007; MELLO et al, 2008).

1.4 HISTOPATOLOGIA NA LEISHMANIOSE

1.4.1 Fígado, baço, linfonodo e pele

Sabe-se que órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), fígado, baço e linfonodo são os mais acometidos pela doença (TAFURI et al, 2001).

O fígado é a segunda maior glândula do corpo, cerca de 3-5% do peso nos carnívoros, e encontra-se localizada caudalmente ao diafragma nos cães. Nesta espécie, o órgão é dividido em seis lobos, sendo estes, o lateral esquerdo e direito, medial, esquerdo e direito, o quadrado e o caudado (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; DYCE, 2010). Possui grande diversidade de tipos celulares dos quais, os mais conhecidos são os hepatócitos e as células de Kupffer, entretanto, estão presentes ainda, células do epitélio biliar, células endoteliais, encontradas nas artérias e veias e nos sinusóides; células estreladas (de Ito), fibroblastos, mesoteliais, neuroendócrinas, sanguíneas, hematopoiéticas, dentre outras (MALARQUEY et al, 2011). Devido a essa variedade, é um órgão complexo que exerce inúmeras funções, desde hematopoiese na vida intra-uterina e neonatal, biotransformação a síntese e armazenamento de proteínas, carboidratos e lipídios, sendo a comunicação entre o sistema digestivo e o sangue (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; MALARQUEY et al, 2011; STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Em pacientes humanos com leishmaniose visceral a função e a morfologia hepáticas são modificadas pela presença de um processo inflamatório em região portal e intralobular, do tipo mononuclear, ora concentrado em focos e, em outros casos, difuso. Tumefação hepatocelular, esteatose e fibroses, portal, em veia central, pericelular e em ponte são vistas dentre os achados. Células de Kupffer, em certo percentual das lâminas analisadas, mostram-se hiperplásicas e invadidas por parasitos. Níveis de ALT, AST, FA e GGT são maiores que os valores esperados, nos indivíduos doentes estudados (EL HAG et al, 1994).

Na infecção experimental com cães, González et al. (1988), utilizou administração intravenosa e intraperitoneal de amastigotas de *L. infantum*, e pode verificar que nas duas formas de inoculação, os animais apresentaram alterações semelhantes no fígado. Foram achados múltiplos granulomas sem localização de predileção, com a visualização do parasito. Inflamação portal linfocitoplasmocitária, às vezes com compressão do parênquima, além de hiperplasia de células de Kupffer com formas amastigotas no seu interior foram vistas. Em um dos indivíduos, foi encontrada balonização de hepatócitos.

Dados de infecção natural, advindos de outros autores corroboram com os achados descritos na infecção experimental. Quando estudados caninos com diferentes formas clínicas, pode-se perceber a presença de infiltrado inflamatório crônico, envolvendo cápsula, região portal, da veia central e parênquima. Formações granulomatosas, sobretudo intrassinusoidais, com células epitelioides presentes, porém sem a visualização de células gigantes. Hipertrofia e hiperplasia de Kupffer e variáveis quantidades de hemossiderina foram encontradas nos macrófagos nas amostras pesquisadas (TAFURI et al, 2001; SANTANA et al, 2007).

Além da hipertrofia e hiperplasia de Kupffer frequentemente vistas nos cães naturalmente infectados, fibrose intralobular foi relatada por Mello et al. (2008), demonstrando que existem diferenças entre infectados e não infectados, havendo maior deposição de colágeno nos animais sintomáticos quando comparado aos assintomáticos.

Quando avaliados quanto à presença e tamanho dos granulomas, indivíduos assintomáticos e sintomáticos não demonstram diferenças entre grupos (SANTANA

et al, 2007). Em cães sintomáticos, carga parasitária, resultados laboratoriais e sinais clínicos específicos não tiveram associação com a intensidade da inflamação (RALLIS et al, 2005).

A semelhança do fígado, o baço é um órgão com funções variadas. O tecido esplênico é responsável por atividades que incluem a hemocaterese, a reciclagem do ferro, indução de resposta imune adaptativa, captura e destruição de microrganismos (MEBIUS e KRAAL, 2005).

Parasitismo ocasionado por *L. infantum* no baço pode ser verificado, especialmente, em região capsular, subcapsular e na zona marginal, de intensidade discreta em animais assintomáticos e, intensa em sintomáticos. Cães infectados, doentes ou não, apresentam alterações na polpa branca com modificação da morfologia dos folículos linfóides que não mais exibem morfologia típica em seus centros germinativos. Há atrofia do manguito periarteriolar com reduzido número de linfócitos circundando a arteríola central (TAFURI et al, 2001; PINTO et al. 2013). Entretanto, em alguns indivíduos, a polpa branca é marcada por uma discreta hiperplasia (TASCA et al., 2009). Estudos demonstram uma redução de células T reguladoras no tecido esplênico, porém indicam que estas são capazes de produzir maior quantidade de IL-10 quando comparados a cães não infectados (SILVA et al, 2014).

O nível organizacional do baço vem sendo alvo de investigações mais aprofundadas buscando a compreensão da relação com padrões de suscetibilidade e resistência à doença. Santana et al. (2008) verificaram que cães potencialmente susceptíveis, que possuíam teste de Montenegro negativo e cultura esplênica positiva, exibiam folículos menores e em número reduzido, assim como alteração da organização folicular esplênica. Outras pesquisas apontam clara associação da forma grave da leishmaniose à desorganização da polpa branca (LIMA et al. 2014).

Além dos achados já mencionados, alterações circulatórias são descritas neste órgão em animais infectados, e abrangem quadros hemorrágicos, congestão e dilatação vascular, assim como é relatada a presença de pigmentos de hematina e hemossiderina no interior de macrófagos (TASCA et al., 2009; SILVA et al., 2013).

Na polpa vermelha, ocorre infiltração macrofágica, sendo encontradas células epitelíoides, com ou sem formação de reação granulomatosa. São vistos também na polpa vermelha, precursores de linhagens hematopoiéticas como megacariócitos e outros tipos celulares, a exemplo de granulócitos. Indivíduos portadores ou não de sintomas podem apresentar periesplenite, fibroplasia do sistema trabecular e espessamento de cápsula (SANTANA et al., 2008; SILVA et al, 2013; PINTO et al. 2013).

Como verificado nos baços, em linfonodos de cães infectados, é também encontrado espessamento da cápsula. Há presença de uma reação inflamatória crônica, predominantemente macrofágica associado à deposição de colágeno (LIMA et al., 2004). O colágeno presente no tecido que originalmente é do tipo III, em animais doentes é substituído colágeno por tipo I (KONDO et al., 2009).

Ocasionalmente pode ser vista capsulite mononuclear 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. As alterações mais proeminentes descritas são um aumento da celularidade em cordões medulares e dos seios medulares, por um infiltrado linfocitoplasmocitário, tanto em assintomático quanto em sintomáticos (COSTA et al., 2008; KONDO et al., 2009).

Na região medular é descrito deposição de pigmentos de hemossiderina no interior de macrófagos dos seios e cordões. Pesquisas indicam que não existem lesões específicas para assintomáticos e sintomáticos (LIMA et al., 2004). No entanto, outros estudos apontam que a hiperplasia e hipertrofia da região cortical, assim como da região medular dos linfonodos, são característicos de animais assintomáticos, enquanto que a atrofia cortical é encontrada mais frequentemente nos sintomáticos (GIUNCHETTI et al., 2008).

Parasitas são vistos em macrófagos da região do seio subcapsular e seios medulares, geralmente em grandes quantidades, mas não encontrados na região cortical (LIMA et al, 2004). Não é encontrada diferença no que tange à carga parasitária entre animais de diferentes formas clínicas (GIUNCHETTI et al., 2008).

Frequentemente apontada como área de grande carga parasitária, a pele de cães infectados por *L. infantum*, possui expressiva importância por estar associado ao processo de transmissão da doença via flebótomo, sendo alvo de investigações e análises isoladas ou concomitantes a outros órgãos (TRAVI et al., 2001; MANNA et al, 2006; PINTO et al., 2013).

Áreas cutâneas de focinho e orelha são mais frequentemente afetadas e com grande parasitismo (COSTA et al, 2008). Amostras de pele de cães infectados e assintomáticos podem não evidenciar alterações inflamatórias, enquanto que nos indivíduos sintomáticos rotineiramente é vista uma dermatite crônica que varia de discreta a intensa, localizada e regiões perivascular e perianexial. A região perifolicular é especialmente acometida, sobretudo no istmo, em alguns casos com envolvimento folicular, gerando foliculite. Em certa parcela dos animais com adenite sebácea é visto a obstrução glandular (SOLANO-GALEGO et al, 2004). O infiltrado compõe-se essencialmente por macrófagos, linfócitos e plasmócitos que estão presentes por toda a derme (COSTA et al, 2008).

Há grande variação na carga parasitária encontrada em secções de pele analisadas por microscopia, sendo nas amostras avaliadas de ausente (TAFURI et al, 2001) a intenso parasitismo (SOLANO-GALEGO et al, 2004), quando comparada às mesmas regiões da pele, fato associado em alguns trabalhos ao padrão e a distribuição do infiltrado (DOS-SANTOS et al, 2004). Animais sintomáticos apresentam maior número de parasitos quando comparados ao grupo dos assintomáticos (GIUNCHETTI et al, 2008).

Tratando-se de uma doença sistêmica como já mencionando anteriormente, as alterações promovidas pela LV não estão restritas a órgãos como a pele, fígado, baço e linfonodo, podendo atingir outros segmentos do corpo, inclusive os rins, pulmões e intestino (POCAI et al, 1998; PINTO et al, 2011; SILVA et al, 2013).

1.4.2 Intestino, rins e pulmões

O intestino é um órgão tubular, provido de lúmen, cuja função primordial é a digestão e absorção dos alimentos ingeridos. É dividido em intestino delgado e grosso. O grosso é subdividido em ceco, cólon e reto, enquanto o delgado, em duodeno, jejuno e íleo. Ao exame histológico é possível distinguir as camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa compondo o órgão (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Cães portadores de LV podem apresentar alterações nos segmentos intestinais e, quando analisados macroscopicamente, os intestinos dos indivíduos portadores desta enfermidade, exibem desde nenhuma alteração (SILVA et al, 2002; GHINATO et al, 2011) a hiperemia em variados graus, e erosões focais em algumas porções, ou ainda, graves lesões nas mucosas (FERRER et al., 1991; PINTO et al., 2013).

Quando investigada a mucosa colônica em caninos sintomáticos, sem histórico prévio de colite, por meio de colonoscopia, em cerca de um quarto dos animais era possível evidenciar regiões hiperêmicas, de edema e erosões (ADAMAMA-MORAITOU et al, 2007). Microscopicamente uma inflamação intensa, composta predominantemente por macrófagos e em menor número linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, localizada principalmente na mucosa, porém também encontrada na muscular da mucosa e na submucosa foi descrita por Ferrer et al (1991), em seu trabalho com segmento de cólon de cães com leishmaniose .

De acordo com Ghinato et al. (2011), o íleo é o segmento mais frequentemente acometido (97,22% - 35/36) e o reto, o menos afetado (72,22%- 26/36) por uma inflamação composta de mononucleares, visto nas camadas mucosa, submucosa e muscular da mucosa.

Em cão assintomático e naturalmente infectado por *L. chagasi*, foi descrita uma reação inflamatória intensa, vista principalmente na mucosa do duodeno e do jejuno, e na mucosa e submucosa de íleo, ceco e cólon, predominantemente linfoplasmocitária, com uma reduzida população de polimorfonucleares (SILVA et al, 2002).

Células gigantes multinucleadas e variáveis quantidades de macrófagos com características peculiares, com citoplasma abundante e núcleo de menor densidade,

células epitelióides, foram observadas em secções avaliadas tanto em animais assintomáticos, quanto sintomáticos em meio ao infiltrado, especialmente na lâmina própria (PINTO et al, 2011; FIGUEIREDO et al, 2014). Decorrente do processo inflamatório, em alguns casos, o tamanho das vilosidades sofre interferência, demonstrando-se mais alargadas que o habitual (SILVA et al, 2002). A inflamação resulta também, em determinadas situações, na perda da continuidade da muscular da mucosa (FIGUEIREDO et al, 2014).

À observação por HE, é possível encontrar, em grande quantidade, formas amastigotas de *Leishmania* em seus vacúolos parasitóforos, contidos nos macrófagos, especialmente na lâmina própria da mucosa de ceco e cólon, tanto em indivíduos sintomático quanto assintomáticos. (SILVA et al, 2002; PINTO et al, 2011).

Dados fornecidos por Figueiredo et al (2014) sustentam que existe uma maior carga parasitária concentrada na muscular da mucosa do ceco e cólon. Há também uma maior produção IL-4 encontrada no cólon em relação ao jejuno e maior síntese de IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10 pelo jejuno quando comparado ao cólon. Além disto, análises por citometria de fluxo nos segmentos intestinais dos animais infectados, revelaram que a expressão de linfócitos CD4⁺ e CD4⁺ Foxp³⁺ Treg foi mais frequente no jejuno que no cólon. Em geral, os cães infectados demonstraram maior quantidade de linfócitos, com superexpressão de células do tipo T CD4⁺ e Foxp³⁺ e uma menor expressão de CD8⁺ em relação aos controles.

Os achados renais verificados nos cães infectados por *L. infantum* envolvem quadros inflamatórios e degenerativos que podem acometer os túbulos, interstício e glomérulos (NIETO et al., 1992). A alteração glomerular mais comumente encontrada nos indivíduos infectados é uma glomerulonefrite membranoproliferativa (COSTA et al, 2003; SOARES et al, 2005). Esta se caracteriza pela proliferação de células endoteliais, epiteliais e mesangiais, resultando em um aumento numérico de células nos glomérulos associado a um processo de espessamento da membrana basal e mesangial, sendo o tipo mais comum de glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos em cães (MCGAVIN e ZACHARY, 2013; SILVA et al. 2013). Em menor proporção, em cães portadores de *L. infantum*, são descritas as

glomerulonefrites mesangioproliferativa, a crescente e ainda a do tipo crônica (COSTA et al, 2003; RIGO et al, 2013).

Nefrite intersticial e túbulo intersticial com predomínio linfoplasmocitário localizado especialmente em região periglomerular e perivascular de intensidade variável e distribuição focal ou difusa têm sido descritas como achados frequentes em indivíduos infectados (POCAI et al., 1998; FERRARI, 2010). O córtex renal é a região mais afetada pela presença desse infiltrado inflamatório (COSTA et al., 2003).

Somam-se aos achados, em cães com sintomatologia ou não da doença, a presença de degeneração hidrópica, vacuolização e presença de cilindros e, restrito aos sintomáticos, pielite mononuclear de moderada intensidade e necrose tubular (SOARES et al.,2005).

O parasitismo em rins, em alguns estudos é baixo, com difícil identificação em HE, e pelo método imunoistoquímico mostra-se evidente em torno de 15% dos indivíduos testados, localizados em células inflamatórias do interstício e glomérulos (FERRARI et al, 2010).

Já os pulmões de cães infectados, sintomáticos ou não, vêm sendo caracterizados por exibirem espessamento de septos associado à presença de fibroplasia, células epiteliais e infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos, linfócitos e plasmócitos (GONÇALVES et al., 2003). Fibroblastos e polimorfonucleares são encontrados em menor proporção. Além das alterações descritas é possível verificar ainda, infiltrado peribronquial e peribronquiolar mononuclear, exudato bronquiolar, degeneração hidrópica e metaplasia escamosa de brônquios e bronquíolos. Em geral, as alterações são focais e variam de discreta a intensa, em raros casos as lesões são difusas (ALVES et al., 2010). É possível encontrar macrófagos intralveolares e em alguns animais broncopneumonia periférica crônica (TAFURI et al, 2001). Nas amostras a presença do parasito constantemente não é verificada (GONÇALVES et al., 2003).

A visualização dos parasitos em amostras coradas através de colorações rotineiras, a exemplo da hematoxilina-eosina (HE), apresenta-se com um desafio, com maior dificuldade para o diagnóstico e avaliação de carga parasitária, especialmente no que se refere a órgãos com número pequeno de formas do

parasito. O emprego do método imunoistoquímico propicia melhores resultados, associados ao aumento de contraste e melhor visualização, com baixo custo, permitindo aumento na sensibilidade e especificidade na detecção do agente (TAFURI et al., 2004; TASCA et al., 2009; TOPLU e AYDOGAN, 2009). Em amostras de tecidos, a imunoistoquímica foi capaz de detectar formas de *Leishmania* em 59% das amostras contra os 28%, vistos no HE, representando um acréscimo considerável nos diagnósticos (COSTA et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Embora existam trabalhos que abordem os aspectos clínicos e histopatológicos na leishmaniose visceral, não existem estudos sistemáticos que descrevam pormenorizadamente os achados histopatológicos e façam a correlação desses aspectos na doença. Tal descrição, correlação e interconecção são importantes, pois outras infecções frequentes em cães tais como as causadas por *Ehrlichia sp.* e *Babesia sp.*, podem levar a alterações semelhantes às descritas como próprias da leishmaniose visceral. Objetivou-se, no presente estudo, descrever de forma sistemática as alterações histopatológicas verificadas, correlacionando com apresentação clínica (assintomáticos e sintomáticos) em cães com leishmaniose visceral, naturalmente infectados. Métodos de extermínio dos reservatórios caninos vêm se mostrando de eficácia questionável para o controle da leishmaniose em humanos (DESJEUX et al, 2004; NUNES et al., 2008) . Sendo assim, o controle da leishmaniose no cão por outros meios, a exemplo da imunoterapia, torna-se de extrema necessidade e, para isso, uma melhor compreensão dos achados histopatológicos da doença em animais com diferentes apresentações clínicas é requerida. Neste intuito, foram utilizadas amostras provenientes de cães capturados em área endêmica para leishmaniose visceral, que habitavam o município de Jequié (BA-Brasil). O trabalho faz parte de uma linha de pesquisa mais ampla do laboratório que visa à identificação de marcadores de susceptibilidade e resistência na LV canina que possam ser utilizados na triagem de reagentes, candidatos ao uso como vacina ou imunoterapia para a doença. O projeto pretendeu, através dos dados obtidos com a execução deste, contribuir para uma melhor definição dos achados histopatológicos relacionadas à leishmaniose visceral canina. Dadas as semelhanças com a doença humana, a compreensão da patologia e da patogênese da leishmaniose visceral canina são informações de caráter relevante para a compreensão da doença humana, mormente dos eventos relacionadas com a doença grave e fatal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Descrição sistemática das alterações histopatológicas encontradas nos diversos órgãos de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados, provenientes do município de Jequié-BA, correlacionando com diferentes manifestações clínicas.

3.2 Objetivos específicos

1. Descrever as principais alterações histopatológicas encontradas em fígado, baço, linfonodos, pele, rins, intestinos e pulmões de cães com leishmaniose visceral.
2. Determinar qualitativa e quantitativamente a carga parasitária no fígado, baço e linfonodo de cães com infecção ativa, positivos na cultura esplênica, PCR e Elisa, para *Leishmania infantum*.
3. Correlacionar os achados histopatológicos encontrados nos cães naturalmente infectados da região de Jequié-BA com as manifestações clínicas da doença.

4. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados materiais e dados experimentais obtidos de 58 cães, de Jequié-Bahia, advindos de pesquisas anteriores do Laboratório de Patologia e Bio-intervenção, presentes em arquivo do Centro Gonçalo Muniz – FIOCRUZ (Bahia-Brasil).

4.1 OS ANIMAIS E PROCEDIMENTOS PRÉVIOS

Os 58 animais, cães errantes, sem raça definida, de idades desconhecidas, previamente capturados no município de Jequié-BA, área conhecidamente endêmica para leishmaniose visceral, permaneceram no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município, por dois dias sem restrições alimentares ou hídricas.

Os indivíduos foram submetidos ao exame clínico e colheita de sangue total com a finalidade de obtenção do soro sanguíneo para provas sorológicas. Foi realizada ainda, punção esplênica destinada à cultura e PCR para diagnóstico de *Leishmania*. Outros testes foram executados no intuito de detectar possíveis co-infecções por *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Dirofilária* e *Borrelia*.

Os cães não resgatados por seus proprietários e com evidências de infecção por *Leishmania sp.* foram previamente sedados com acepromazina (0,1 mg/kg IV, Aceprom% 1, Vetril Brasil), anestesiados com tiopental (15 mg/kg IV, Thiopentax 1g Cristalia, Brasil), e em seguida eutanasiados por administração intracardíaca de solução saturada de cloreto de potássio (2 mL/kg). Em seguida, os indivíduos foram submetidos à necropsia e colheita de fragmentos dos tecidos. O estudo tem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do CPqGM-FIOCRUZ (CEUA, parecer nº 015/2009; CEUA parecer nº 017/2010).

4.1.1 Exame clínico dos cães

Os cães foram identificados e examinados clinicamente por ao menos dois médicos veterinários, que por meio de ficha clínica padronizada, indicavam o sexo e porte, estimavam a idade, verificavam estado de consciência e avaliavam os sinais nos diversos sistemas. Constavam na ficha, itens como anemia, apatia, conjuntivite, desidratação, emaciação, esplenomegalia, linfadenopatia, onicogribose e alterações cutâneas, a exemplo de, alopecia, erosão, presença de nódulos e ulceração, além de possíveis alterações inflamatórias em sistemas como locomotor, respiratório, reprodutor e digestório.

As informações obtidas foram cadastradas em banco de dados e parte dos critérios analisados serviu para classificação dos animais. Para definir o estado clínico dos indivíduos, os sinais utilizados foram: anemia, conjuntivite, emaciação, linfadenopatia, esplenomegalia, alopecia, dermatite, erosão, ulceração e onicogribose.

Anemia, ao exame clínico, foi conferida pela presença de mucosas da conjuntiva palpebral ou em regiões da mucosa oral mais pálida do que a esperada para espécie e idade. Conjuntivite foi caracterizada por inflamação da conjuntiva com presença de secreção purulenta. Emaciação foi relatada quando o animal exibia proeminências ósseas evidentes em regiões da pelve e costela, além de atrofia muscular em escápula e osso temporal. Indivíduos denominados magros demonstravam protuberâncias ósseas do coxal e das costelas, enquanto os ditos como caquéticos, apresentavam além das condições mencionadas para os magros, atrofia da musculatura escapular e temporal. Linfadenopatia foi definida para cães com peso inferior a 5 kg como linfonodos maiores que 2 cm, ao passo que, animais com peso no intervalo de 5 a 10 kg esse valor era de 3,5 cm e nos cães com peso superior a 10kg o tamanho era de 4 cm, todos medidos em seu maior eixo. Esplenomegalia estava presente quando os indivíduos exibissem baço palpável além da última costela.

Alopecia foi diagnosticada na avaliação por áreas da pele que seriam regiões hirsutas, porém se encontravam sem pelos. Dermatite foi notificada em condições

inflamatórias na pele. Onicogribose foi relatada quando os animais apresentaram aumentos das unhas maior que 1 (um) cm em todos os membros. Erosões foram descritas quando era notada a perda de parte ou toda espessura da epiderme enquanto úlceras foram definidas quando havia perda da camada epitelial com a superfície granular e arestas elevadas. Utilizando os critérios listados e descritos acima, os animais foram classificados de acordo com as manifestações em:

Assintomáticos: Cães que exibiam até 2 sinais clínicos do grupo anteriormente explicitado.

Sintomáticos: Indivíduos que apresentavam 3 ou mais sinais.

4.1.2 ELISA Indireto

Foram obtidas amostras de sangue total pela venopunção da veia cefálica destinados a centrifugação retirada do soro para realização dos exames sorológicos. Os soros dos cães foram encaminhados para serem testados e serviram para determinação de anticorpos do tipo IgG contra *Leishmania*. Dados experimentais anteriores fundamentaram a concentração adequada para a sensibilização da placa que foi utilizada. Um volume de 100µL por orifício, de antígeno solúvel de *L. chagasi* (15µg/ml) em tampão carbonato (0,06 M, pH 9,6) foi adicionado a placas de microtitulação contendo 96 poços (Cliniplate-Labsystem), overnight a 4°C, para adesão à placa. O bloqueio das reações inespecíficas se deu pelo uso de solução de PBS e leite desnatado a 10%. Em seguida, a placa foi lavada por três vezes com solução de PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBS-T) e empregada nos exames. Os soros foram diluídos em PBS-T adicionado de leite desnatado a 10%, em diluições de 1:400 e 1:1000, e depositados nos poços para posterior lavagem seguida de adição do conjugado de IgG canino e peroxidase (Bethyl Laboratories), na proporção de 1:1000 (PARANHOS-SILVA et al., 2003).

As reações foram procedidas de acordo com o trabalho de Santos e colaboradores (1996). Os resultados foram obtidos conforme leitura da densidade ótica das amostras.

4.1.3 Cultura

Meio ágar sangue Novy e MacNeal, modificado por Nicolle (NNN), bifásico e a 23°C, suplementado com soro fetal bovino a 20% (Gibco BRL, Nova Iorque, EUA), adicionado de 100µg de gentamicina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) para inibição de crescimento de microrganismos indesejados, foram acrescidos aos aspirados esplênicos colhidos assepticamente com objetivo de promover crescimento das formas de *Leishmania* para seu diagnóstico.

As culturas foram devidamente identificadas, possuíam duplo controle e foram mantidas em estufa a 24°C. Durante quatro semanas, uma vez por semana, as amostras foram acompanhadas e avaliadas. A observação microscópica para identificação do parasito foi executada por dois observadores.

4.1.4 PCR em tempo real (qPCR)

Amostras de tecido esplênico para participação dessa etapa foram colhidos utilizando material estéril, mantidos em criotubos livres de DNase e RNase e conservados em nitrogênio líquido. DNA de 10 mg de baço foi extraído como descrito pelo fabricante do kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sofreu avaliação de qualidade e quantidade por espectrofotometria digital (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Ao final, as alíquotas preparadas tinham a concentração de 30 ng/µL e foram mantidas a -20°C.

Os ensaios de PCR realizados foram baseados no protocolo descrito por Francino e colaboradores (2006).

Para as reações foram adicionados 2 µL de amostra de DNA (30ng/mL), 12,5 µL Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA); 1, 5 µL de primer forward sequência 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3'; 1, 5 µL primer reverse 5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3', ambos a concentração 900nM, e 2,5 µL de uma sonda fluorogênica 5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3.' a 200nM. A sonda foi confeccionada juntamente com uma molécula FAM *repórter* ligada à extremidade 5', e um MGB-QNQ *quencher* ligada à extremidade 3' (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

As reações aconteceram em termociclador nas seguintes temperaturas e tempos:

Primeira e segunda etapas constituídas de um ciclo apenas, a primeira a 50°C por 2 (dois) minutos, e segunda a 95°C durante 10 minutos, e uma terceira fase, esta com 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C perdurando um minuto. A quantidade de DNA do parasito foi definida comparando valores de *threshold* Cycle (Ct) e valores do ponto de corte da curva padronizada a partir de diluições seriadas 10 vezes de DNA de *Leishmania infantum/chagasi* (estirpe MHOM / BR / 2000/MER2), contendo de 10^5 até 10^{-1} . A reação de amplificação se deu por meio do sistema ABI Prism 5900 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Tanto a diluição do parasito como a fase de amplificação do material ocorreu em triplicata. Os valores encontrados em cada placa foram normalizados por um Ct comum (0,102029). A partir disso, para cada amostra foi calculado um Ct baseado no ponto que a reação de fluorescência não foi além do *threshold* comum. Amostras com Ct maiores que o ponto de corte, determinados pela Receiver Operator Characteristic-curva (ROC), foram consideradas negativas enquanto as menores que o referido ponto, foram ditas como positivas.

Para investigar possíveis interferências e normalizar as amostras foi realizada a amplificação do gene 18S rRNA canino, utilizando reagentes TaqMan assay (Perkin-Elmer Applied Biosystems). As diluições nas placas e o processo de amplificação ocorreram em triplicata. As condições de temperatura, número de ciclos e duração que foram empregadas no processo foram as mesmas, tanto na amplificação de material genético de *Leishmania* quanto para o gene canino. Para a reação foram adicionados 5 µL da amostra de DNA canino (30 ng/µL), 12,5 µL da Universal Mastermix (Perkin-Elmer Applied Biosystems), 1,25 µL do 18S GeneEx Assay (Perkin-Elmer Applied Biosystems) e água deionizada para completar o volume de 25 µL. A amplificação empregou o sistema de detecção de sequência ABI Prism 5900 (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Uma curva padrão para cada reação foi produzida com valores que variavam de 450 a 18,75 ng. Utilizando a comparação entre Ct da amostra e o Ct padrão foi possível quantificar os genes-alvo.

4.2. Colheita, fixação e processamento histopatológico.

Foram colhidos no ato necroscópico fragmentos de linfonodo poplíteo, baço, fígado, rins, intestino (íleo) e pulmões do antímero esquerdo e direito do animal, que em seguida, foram fixados em formalina tamponada a 10%, em volume suficiente, por 48 horas e processadas para desidratação e clarificação e posteriormente submetidas ao método rotineiro de inclusão em parafina.

Os blocos obtidos com as amostras histológicas sofreram cortes de 4 μm e coloração pela Hematoxilina-eosina (HE). Colorações especiais como Grocott, ácido periódico-Schiff (PAS), PASM, Picrossirius e Fite-Faraco foram empregadas a depender da suspeita levantada para diferenciação de alguns elementos, quando necessárias. As lâminas montadas foram analisadas por meio de microscopia ótica convencional em busca de alterações histopatológicas.

4.3 Análises histopatológicas

Secções histológicas de fígado, baço, linfonodos, pele, intestino delgado, pulmões e rins foram analisados sem o conhecimento do perfil clínico do animal, por meio de estudo blindado.

Todas as lâminas foram avaliadas quanto à ausência e presença de inflamação que, quando presente, foram analisadas quanto aos tipos celulares envolvidos, a forma de distribuição, intensidade e localização do infiltrado.

A intensidade da reação foi classificada em uma escala semi-quantitativa que variou de ausente (0); discreta (1); moderada (2) a intensa (3). Alterações vasculares, degenerativas, de maturação, proliferação e crescimento e acúmulos de pigmentos também foram verificadas. As secções, em sua totalidade, foram avaliadas quanto à presença de formas amastigotas de *Leishmania sp.*

No fígado, avaliou-se a arquitetura, os infiltrados inflamatórios quanto a sua localização em relação aos ácinos hepáticos, sua intensidade e distribuição. A hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer foi investigada, assim como a

presença e composição celular dos granulomas. Procurou-se também, a linfocitose intrassinusoidal e ainda outras alterações como esteatose, balonização e necrose hepatocelular, além da fibrose que foi descrita e semi-quantificada.

Os baços foram verificados quanto à organização arquitetural e citológica, levando-se em consideração atrofia do tecido linfóide e classificados em tipos 1, 2 e 3, correspondendo o tipo 1 ao tecido linfóide bem organizado, o 2 ao moderadamente desorganizado e o 3 ao extensivamente desorganizado, de acordo com os estudos previamente descritos por Santana et al., 2008. Na classificação proposta pelo autor, folículos esplênicos em animais infectados exibiam organização diferentes, variando de tecido linfóide bem organizado a tecido linfóide extensivamente desorganizado conforme a disposição das zonas foliculares. Nos bem organizados era possível evidenciar de forma clara e distinta os linfócitos da bainha periarteriolar, o centro germinativo e as zonas do manto e marginal, o que no moderadamente desorganizado não era possível ser percebido, neste último a definição não conseguia ser realizada. Por fim, os extensivamente desorganizados eram caracterizado pela estrutura folicular com distinção fraca, mal distinta entre polpa branca e polpa vermelha. Procurou-se ainda, a ocorrência de plasmocitose, periesplenite e evidências de hematopoiese extramedular.

Nos linfonodos, foi avaliada a arquitetura do tecido, dos folículos em número, tamanho e características. Observados também, a dilatação e histiocitose dos seios subcapsular e medular, morfologia dos cordões medulares, plasmocitose, capsulite.

Na pele, analisaram-se as características organizacionais, observando a camada córnea, quanto a alterações na queratinização; a epiderme e suas divisões, quanto continuidade, lesões hiperplásicas, dentre outras; a derme e suas estruturas vasculares e os anexos cutâneos. A presença de inflamação, tipo e a composição celular, distribuição, intensidade foram também alvo das investigações.

No intestino foi sistematicamente buscado a ocorrência de inflamação, atrofia vilositária e presença de parasitos, tanto helmintos quanto protozoários. Nos rins, investigou-se a presença de nefrite intersticial, pielite, lesões glomerulares e tubulares. Nos pulmões, buscou-se a inflamação aguda nos alvéolos, pneumonite intersticial, edema, congestão, hemorragias e acúmulos de pigmentos.

Para melhor avaliação da carga parasitária, fragmentos selecionados foram submetidos ao processamento imunoistoquímico.

4.4 Processamento Imunoistoquímico

Baço, fígado e linfonodo poplíteo de animais com infecção ativa e positivos simultaneamente nos testes de cultura esplênica, ELISA e PCR, passaram por processamento imunoistoquímico com o uso do sistema de detecção livre de biotina Reveal (*Spring Biosciences*, Pleasanton, CA, USA) para melhor visualização do parasito. Ao total, 15 animais reuniam as características de positividade concomitante para os testes citados, porém, um dos animais exibia extensa necrose hepática e outros comprometimentos, sendo então excluído, e as imunoistoquímicas realizadas em 14 indivíduos.

As secções foram cortadas à espessura de 4 μ m e colocadas em lâminas que passaram por tratamento prévio com solução de Poly-L-Lisine (Sigma, St. Louis, MO, USA). As lâminas com os cortes sofreram desparafinização em xilol P. A. por três vezes, durante 10', seguida de imersão em álcool absoluto por duas vezes por 5', e lavagem em água corrente e destilada por três vezes cada.

Na sucessão, bloqueio da peroxidase endógena, em solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos foram executadas. Posteriormente a estes passos, foram procedidas lavagens com água destilada e tampão PBS-T, além de realização de bloqueio de reações inespecíficas, com solução contendo caseína, por cerca de 20 minutos e nova lavagem com PBS-T.

O anticorpo policlonal anti-*Leishmania*, produzido em coelho, foi utilizado como anticorpo primário, diluído na concentração de 1:3000 e incubado *overnight* em torno de 4°C. Após a primeira incubação foi realizada lavagem com tampão já citado, por três vezes, durante 5 minutos. No passo seguinte, foi adicionado o complemento que permaneceu por 10' para adição do conjugado por 15'.

Após transcorrido o tempo da reação, foram executadas três lavagens com PBS-T para revelação por meio do cromógeno DAB. As lâminas foram contra-coradas pela hematoxilina de Harris e montadas com lâmina e lamínula.

4.5 Avaliação da carga parasitária

Após a realização da imunoistoquímica, a carga parasitária nos órgãos foi determinada através da captura e contagem de imagens de campos aleatórios em determinados segmentos, condicionados a arquitetura do órgão. Foi selecionado ainda, um ponto de maior densidade de leishmanias em cada lâmina analisada, denominada de *hotspot*. Sendo assim, no fígado, foram obtidas e contadas 5 imagens randômicas correspondentes a espaço porta e região periportal, 5 de região de veia central, 5 de região de parênquima e o *hotspot* determinado em cada caso. No baço, foram captadas 5 fotos de periferia e 5 de centro do órgão, além do ponto de maior densidade parasitária. Nos linfonodos, 5 imagens de cada segmento foram obtidas nas regiões do seio subcapsular, seio medular, cordões e uma correspondente ao *hotspot*. As fotos foram captadas utilizando câmera *Q image micropublisher 3.3 RTV* acoplada a microscópio óptico *Olympus BX53* em aumento de 400 vezes e auxílio do programa *Image-Pro Plus 7.0*. As contagens ocorreram em *software* de processamento e análise de imagens, *Image J*. A carga parasitária foi medida em unidades contadas nas imagens.

4.6 ANÁLISE E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Para análises estatísticas e melhor representação dos resultados, foram utilizados os softwares Excel, STATA Statistics/Data Analysis 12.0. O teste exato de Fisher foi empregado para observação de possíveis diferenças entre grupos, em um nível de significância que $p < 0,05$. Os resultados foram demonstrados em valores absolutos ou relativos em tabelas e gráficos ou incorporados ao texto.

5.0 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os 58 animais incluídos no estudo foram positivos para pelo menos uma das provas de ELISA, PCR ou cultura para infecção por *Leishmania*. Destes, 49 (84,48%) tinham títulos de anticorpos anti-*Leishmania* no soro quando testados por ELISA e em 20 deles (34,48%), formas promastigotas se desenvolveram em cultura a partir de seus aspirados esplênicos. Na amplificação do DNA de *Leishmania*, pela técnica do qPCR, foram testados 54 animais, e foi encontrado material do parasito em 53 cães (98,15%). Quinze animais apresentaram simultaneidade de positividade nas três provas. Dos 58 animais incluídos, nove foram enquadrados como assintomáticos e 49 sintomáticos de acordo com o critério de classificação utilizado. Em relação aos sinais clínicos, foram vistas linfadenopatia em 91,38% (53/58), palidez de mucosas em 68,97% (40/58), esplenomegalia 65,32% (38/58), onicogrifose 53,45% (31/58), emagrecimento 32,76% (19/58), alopecia 43,10% (25/58), úlceras 13,79% (8/58) e erosões cutâneas 48,28% (28/58), dermatite 13,79% (8/58) e conjuntivite (15,52%).

Na amostra como um todo, a maioria dos animais tinha faixa etária estimada entre três a cinco anos (34/58, 58,62%), eram de médio porte (36/58, 62,07%) e machos (32/58, 55,17%). Essas características tiveram distribuição semelhante no grupo de animais sintomáticos. O grupo de assintomáticos, por outro lado, era formado, em sua maioria, por animais mais jovens, com dois ou menos anos de idade (5/9, 55,56%), tinha mais fêmeas (5/9, 55,56%), mas também eram de porte médio. Dados adicionais podem ser vistos pela tabela 1. Não houve diferenças estatísticas nos critérios sexo ($p=0,717$) e idade ($p=0,106$), porém o porte médio foi significativamente maior nos assintomáticos ($p=0,087$, teste exato de Fisher).

Elisa foi realizado com o soro de todos os animais. O teste foi positivo em aproximadamente 84,5% dos animais. Dentre os animais sintomáticos, 83,7% (41/49) tiveram o teste positivo. A positividade foi um pouco maior entre os animais

assintomáticos com oito de nove animais positivos no teste (cerca de 89%). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à manifestação clínica e positividade no teste de Elisa ($p= 1,00$).

O PCR amplificou material genético do parasito em todos os animais do grupo assintomático (100%). O teste foi realizado em 45 animais do grupo sintomático e foi positivo em 44 (89,8%) e negativo em um (2,04%). Em quatro animais desse grupo, não foi realizado o teste. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre manifestações clínicas e a positividade no teste ($p=1,00$)

Cultura para *Leishmania* foi realizada em todos os animais estudados. Dos 58 cães, 20 tiveram cultura positiva. Dos 49 animais sintomáticos, 18 (36,7%) tiveram parasitos crescendo na cultura. Entre os assintomáticos, dois dos nove animais (22,2%) foram positivos nesse teste. Com relação à cultura, não houve diferença estatisticamente significativa entre assintomáticos e sintomáticos ($p=0,476$).

Tabela 1. Características gerais e em diferentes manifestações clínicas da população de cães infectados por *Leishmania sp.* do município de Jequié-Ba.

Critério	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
	58 (100)	9 (100)	49 (100)
Idade estimada			
0 a 2 anos	17 (29,31)	5 (55,56)	12 (24,49)
3 a 5 anos	34 (58,62)	3 (33,33)	31 (63,27)
Acima de 6 anos	7 (12,07)	1 (11,11)	6 (12,24)
Sexo			
Macho	32 (55,17)	4 (44,44)	28 (57,14)
Fêmea	26 (44,83)	5 (55,56)	21 (42,86)
Tamanho			
Pequeno	15 (24,14)	0 (0)	15 (30,61)
Médio	37 (63,79)	9 (100) ^a	27 (55,1)
Grande	6 (10,34)	0 (0)	6 (12,24)
Não informado	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Elisa			
Positivo	49 (84,48)	8 (88,89)	41 (83,67)
Negativo	9 (15,51)	1 (11,11)	8 (16,33)
Cultura			
Positiva	20 (34,48)	2 (22,22)	18 (36,73)
Negativa	38 (65,52)	7 (77,78)	31 (63,27)
PCR			
Positiva	53 (91,38)	9 (100)	44 (89,8)
Negativa	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
NT*	4 (6,9)	0 (0)	4 (8,16)

*NT: Não testadas a: exato de Fisher $p=0,0087$; idade $p=0,106$; sexo $p=0,717$; ELISA $p=1,000$; Cultura $p=0,476$; PCR $p=1,000$.

5.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA NOS CÃES INFECTADOS COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LVC

5.2.1 Fígado

Foram coletados fragmentos de fígado de 57 animais. Uma das amostras foi excluída por problemas técnicos. Para análise desse órgão, foram considerados 56 casos.

Infiltrado inflamatório em espaços porta foi observado em 94,64% (53/56) dos casos. A intensidade foi discreta em 67,86% (38/56), moderada em 21,43% (12/56) e intensa em 5,36% (3/56). O infiltrado era composto em sua maior parte por células inflamatórias mononucleares. Predominou a infiltração mista de linfócitos, macrófagos e plasmócitos em 50% (28/56) dos casos, seguida de infiltrado linfoplasmocitário em 37,50 % (21/56). Neutrófilos foram vistos de permeio às células mononucleares em cerca de 34% dos casos. Os animais sintomáticos apresentaram com maior frequência infiltrados mais intensos que os assintomáticos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa.

No grupo dos assintomáticos a inflamação portal era linfoplasmocitária (3/9,33, 33%), linfo-histioplasmocitária (5/9, 55,56%) ou plasmocitária (1/9, 11,11%). De forma semelhante, nos sintomáticos, foi linfo-histioplasmocitária (23/47, 48,94%), linfoplasmocitária (18/47, 38,30 %) ou plasmocitária (Tabela 2).

A intensidade da inflamação portal nos assintomáticos foi discreta (8/9, 88,89%) ou moderada (1/9, 11,11%). Nos sintomáticos foi discreta em 63,83% (30/47), moderada em 23,40% (11/47) e intensa em 6,38% (3/47). As intensidades vistas são representadas também na figura 1. Comparando os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa para tipo de infiltrado em espaço porta ($p=0,922$), nem intensidade de inflamação em espaço porta ($p=0,810$).

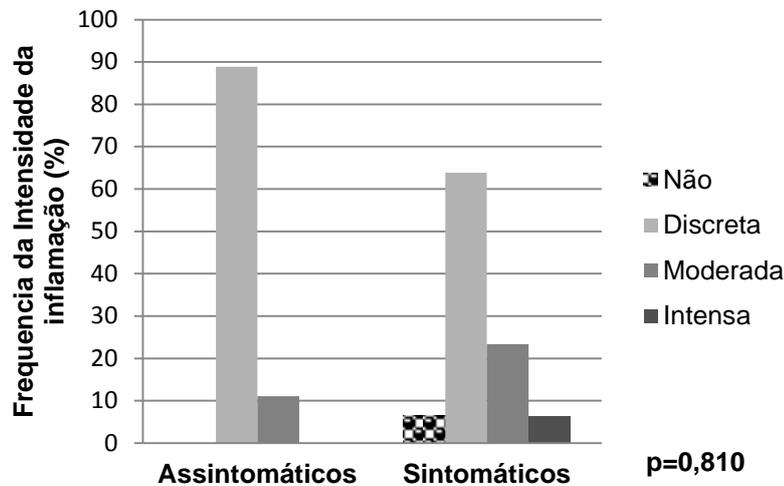


Figura 1. Frequências no critério de intensidade de inflamação nos grupos em espaço porta nos cães naturalmente infectados.

Inflamação circundando a veia centrolobular foi observada em aproximadamente 91% (51/56). Em geral, os infiltrados linfo-histioplasmocitário (28/56, 50%) e o linfoplasmocitário (21/56, 37,5%) predominaram nas amostras. No grupo dos assintomáticos a inflamação perivenular foi linfo-histioplasmocitária em 55,56% (5/9), linfoplasmocitária em 33,33% (3/9) e plasmocitária em 11,11% (1/9). Nos animais sintomáticos foi linfo-histioplasmocitária em 44,68% (21/47), linfoplasmocitária em 38,30% (18/47), plasmocitária em 4,27% e linfomacrofágica em 2,13% (1/47).

A intensidade do infiltrado encontrado em torno da central nas amostras foi discreta em 62,5% (35/56), moderada em 26,79% (15/56) e intensa em 1,79% (1/56). Nos assintomáticos a intensidade do infiltrado perivenular central era discreto em 88,89% (8/9) e moderada em 11,11% (1/9). Nos animais sintomáticos foi de intensidade discreta em 57,45% dos casos (27/47), moderada em 29,79% e intensa em 2,13% (1/47). Os tipos de infiltrado e intensidades das alterações encontram-se resumidos na tabela 2 e as intensidades demonstradas na figura 2. Comparando os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa para tipo de infiltrado em veia central (p=0,641), nem intensidade de inflamação em veia central (p=0,427).

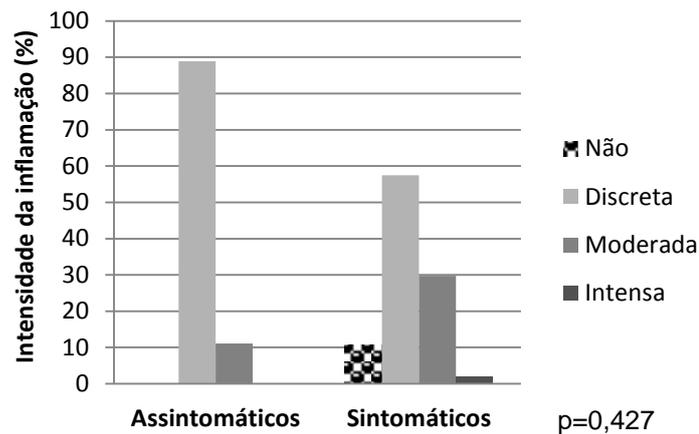


Figura 2 . Frequências no critério de intensidade de inflamação perivenular central nos grupos nos cães naturalmente infectados.

Tabela 2 . Tipo de infiltrados encontrados e intensidade de inflamação registradas em espaços porta e perivenular central nos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba.

Critério	Amostra	Assintomáticos	Sintomáticos
	n (%)	n (%)	n (%)
	56 (100)	9 (100)	47 (100)
Tipo de infiltrado portal			
Plasmocitário	4 (7,14)	1 (11,11)	3 (6,38)
Linfoplasmocitário	21 (37,5)	3 (33,33)	18 (38,3)
Linfo-histioplasmocitário	28 (50)	5 (55,56)	23 (48,94)
Inflamação portal			
Ausente	3 (5,36)	0 (0)	3 (6,38)
Discreta	38 (67,86)	8 (88,89)	30 (63,83)
Moderada	12 (21,43)	1 (11,11)	11 (23,4)
Intensa	3 (5,36)	0 (0)	3 (6,38)
Tipo de infiltrado perivenular			
Plasmocitário	3 (5,36)	1 (11,11)	2 (4,26)
Linfoplasmocitário	21 (37,5)	3 (33,33)	18 (38,3)
Linfo-histioplasmocitário	26 (46,43)	5 (55,56)	21 (44,68)
Linfomacrofágico	1 (1,79)	0 (0)	1 (2,13)
Inflamação perivenular			
Ausente	5 (8,93)	0 (0)	5 (10,64)
Discreta	35 (62,5)	8 (88,89)	27 (57,45)
Moderada	15 (26,79)	1 (11,11)	14 (29,79)
Intensa	1 (1,79)	0 (0)	1 (2,13)

Tipo de infiltrado portal p= 0,922 ; intensidade de inflamação portal p= 0,810 ; tipo de inflamação perivenular p=0,641; Intensidade de inflamação perivenular p=0,427.

Hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer foram encontradas em 82,14 (46/56) e 78,57% (44/56) dos animais, respectivamente. Hipertrofia moderada foi a mais frequente, sendo observada em 22 cães (22/56-39,29%). Nos assintomáticos, a hipertrofia de células de Kupffer foi discreta em 22,22% (2/9) e moderada em 55,56% (5/9). Nos sintomáticos foi discreta ou moderada em 36,1% (17/47), e intensa em 6,4% (3/56) (Tabela 3). Não houve diferenças estatísticas significantes nas intensidades de hipertrofia de Kupffer ($p=0,758$) entre os grupos avaliados.

Em relação à hiperplasia, foi de intensidade moderada em 23 animais (23/56, 41,07%), em discreta em 20 cães (20/56, 35,71%) e intensa em três casos (3/56, 5,36%). Nos assintomáticos, a hiperplasia de células de Kupffer foi moderada em cinco (5/9, 55,56%) e discreta em dois casos (2/9, 22,22%). Nos sintomáticos, a hiperplasia de Kupffer foi discreta ou moderada em 18 (18/47, 38,30%). (Tabela 3). Não houve diferenças estatísticas significantes na intensidade de hiperplasia ($p=0,742$) entre os grupos avaliados.

Linfocitose intrassinusoidal foi verificada em 89,29%, com intensidade moderada em 50% (28/56) das amostras. Nos assintomáticos, todos os animais mostravam linfocitose que foi discreta em 44, 44% (4/9), moderada em 11,11% (1/9) e intensa em 44, 44% (4/9). Nos sintomáticos a alteração foi encontrada em 87% dos casos (41/47) e foi discreta em 14,89% (7/47), moderada em 57,45% (27/47) e intensa em 14,89% (7/47). De forma distinta ao que se passou no grupo dos assintomáticos, a linfocitose intrassinusoidal vista nos sintomáticos foi moderada, enquanto nos assintomáticos foi discreta ou intensa. Associado aos linfócitos, em seis amostras (6/56-10,71%) de cães sintomáticos (6/47, 12,76%), havia neutrófilos nos sinusoides (Tabela 3). Quando comparadas as intensidades de linfocitose intrassinusoidal, a forma moderada foi mais frequente nos sintomáticos (teste exato de Fisher, $p= 0,008$).

Tabela 3. Dados obtidos nos critérios das análises de hiperplasia e hipertrofia de Kupffer e linfocitose intrassinusoidal nos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba.

Critério	Amostra	Assintomáticos	Sintomáticos
	n (%)	n (%)	n (%)
	56(100)	9 (100)	47(100)
Hipertrofia de Kupffer			
Ausente	12 (21,43)	2 (22,22)	10 21,28
Discreta	19 (33,93)	2 (22,22)	17 (36,17)
Moderada	22 (39,29)	5 (55,56)	17 (36,17)
Intensa	3 (5,36)	0 (0)	3 (6,38)
Hiperplasia de Kupffer			
Ausente	10 (17,86)	2 (22,22)	8 (17,02)
Discreta	20 (35,71)	2 (22,22)	18 (38,3)
Moderada	23 (41,07)	5 (55,56)	18 (38,3)
Intensa	3 (5,36)	0 (0)	3 (6,38)
Linfocitose			
Ausente	6 (10,71)	0 (0)	6 (12,77)
Discreta	11 (19,64)	4 (44,44)	7 (14,89)
Moderada	28 (50)	1 (11,11)	27 (57,45) ^a
Intensa	11 (19,64)	4 (44,44)	7 (14,89)

a: p=0,008 Intensidade da hipertrofia de Kupffer p= 0,758; intensidade de hiperplasia de Kupffer p=0,742; Intensidade de linfocitose intrassinusoidal p=0,008.

Granulomas foram encontrados em diferentes localizações em relação aos lóbulos/ácinos hepáticos, de tamanhos e em quantidades variadas. Na maioria, predominaram granulomas médios e em pequena quantidade, de localização intrassinusoidal.

Granulomas foram encontrados em região portal (4/56, 7,14%), em torno de veia central (1/56, 1,79%), intrassinusoidais (12/56, 21,43%) e em combinações nessas áreas; portal e intrassinusoidal (1/56, 1,79%) e portal e veia central (1/56, 1,79%). Nos assintomáticos, 22,22% (2/9) localizavam-se nos sinusóides e em 11,11% (1/9) em espaço porta. Nos sintomáticos, as localizações foram mais variadas: 6,38% (3/47) foram portais, 21,28% (10/47) foram intrassinusoidais e, em um animal em torno da veia central (1/47, 2,13 %). Nesse grupo um animal tinha granulomas em espaços porta e intrassinusoidais (1/47, 2,13%), e outro granulomas em espaço porta e em torno de veia central (1/47, 2,13%) (Tabela 4). Não foram

encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos sintomático quanto a esse parâmetro ($p=0,910$).

Granulomas de tamanho pequeno foram encontrados em 12,50% dos casos (7/56), médios em 14,29% (8/56) e os grandes em 7,14% (4/56). Nos animais assintomáticos, os granulomas foram pequenos em 11,11% dos casos (1/9) e médios em 22,22% (2/9). Nos sintomáticos, 12,77% (6/47) foram de tamanho pequeno, 12,77% (6/47) foram médios e 8,51% (4/47) grandes (Tabela 4). Não houve diferença entre os grupos para o critério tamanho de granulomas entre as diferentes manifestações ($p=0,855$).

A intensidade dos granulomas nos tecidos analisados foi discreta em 26,79% (15/56), moderada em 1,79% (1/56), e intensa em 5,36% (3/56). Nos assintomáticos, foram encontrados granulomas em pequena quantidade em 33,33% dos animais (3/9). Nos sintomáticos vistos em quantidade discreta em 25,53% (12/47), moderada em 2,13% (1/47) e intensa em 6,38% (3/47) (Tabela 4). As diferenças observadas não tiveram significância estatística ($p=0,857$).

Tabela 4. Frequências obtidas nos parâmetros localização, intensidade e tamanho dos granulomas dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba.

Critério	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
	56(100)	9 (100)	47 (100)
Localização Granulomas			
Intrassinusoidal	12 (21,43)	2 (22,22)	10 (21,28)
Portal	4 (7,14)	1 (11,11)	3(6,38)
Portal e Intrassinusoidal	1 (1,79)	0 (0)	1 (2,13)
Portal e veia central	1 (1,79)	0 (0)	1 (2,13)
Veia central	1 (1,79)	0 (0)	1 (2,13)
Intensidade Granulomas			
Ausente	37(66,07)	6 (66,67)	31(65,96)
Discreta	15 (26,79)	3 (33,33)	12 (25,53)
Moderada	1 (1,79)	0 (0)	1 (2,13)
Intensa	3(5,36)	0 (0)	3(6,38)
Tamanho Granulomas			
Ausente	37(66,07)	6 (66,67)	31(65,96)
Pequeno	7 (12,50)	1 (11,11)	6 (12,77)
Médio	8 (14,29)	2 (22,22)	6 (12,77)
Grande	4 (7,14)	0 (0)	4 (8,51)

Localização dos granulomas $p= 0,910$; intensidade dos granulomas $p=0,857$; tamanho dos granulomas $p= 0,855$.

Congestão sinusoidal apareceu em diferentes intensidades em 33,93% das amostras hepáticas analisadas, enquanto congestão de veia central foi verificada em 23,21%.

Alterações degenerativas hepatocelulares foram observadas, sendo as mais comuns a balonização e a esteatose. Esteatose foi observada em 21,43% (12/56) dos animais, do tipo macrovacuolar em nove casos (9/56), e macro e microvacuolar em três (3/56-5,36%), de localização variável em relação ao lóbulo/ácino. Balonização hepatocelular foi vista em 10 cães (10/56-17,86%) sendo discreta em 14,3% (8/56) e moderada em 3,6% (2/56) (Tabela 5). Nos cães assintomáticos, um animal apresentou balonização discreta (1/9-11,11%), mas não houve significância estatística a diferença entre os grupos ($p=1,00$).

Necrose hepatocelular foi encontrada em 18% das amostras com pequenos focos únicos ou múltiplos. A intensidade ($p=1,00$) e distribuição ($p=0,466$), não tiveram diferenças significativa. Apoptose hepatocelular foi vista em três animais (3/56-5,36%).

Fibrose portal discreta ou moderada, em placa ou formando septos foi detectada em 7,14% (4/56) dos fragmentos e em todos os casos os animais eram do grupo dos sintomáticos (4/47-8,51%).

Tabela 5. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros balonização, esteatose e positividade de parasitismo em HE nas amostras dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
	56 (100)	9 (100)	47 (100)
Balonização	10 (17,85)	1 (11,11)	9 (19,14)
Esteatose	12 (21,43)	2 (22,22)	10 (21,27)
<i>Leishmania</i>			
Sim	21 (37,5)	1 (11,11)	20 (42,55)
Não	35 (62,5)	8 (88,89)	27 (57,45)

Balonização $p= 1,000$; esteatose $p= 0,530$; *Leishmania* $p= 0,132$.

Os dados obtidos pela análise por HE evidenciaram material compatível com formas amastigotas de *Leishmania sp.* em 37,5% (21/56), destes, apenas 1 animal

(1/9-11,11%) pertencia ao grupo dos assintomáticos, enquanto os outros 20 (20/47, 42,55%) aos sintomáticos (Tabela 5). As formas do parasitos foram encontradas em células de Kupffer, em macrófagos nos infiltrados inflamatório presentes em espaços porta e veia central, nos granulomas intrassinusoidais, nos portais e de veia central e ainda em macrófagos de agregados celulares formados nos sinusóides. Quando submetidos a análises estatísticas, os grupos não evidenciaram diferenças ($p= 0,132$).

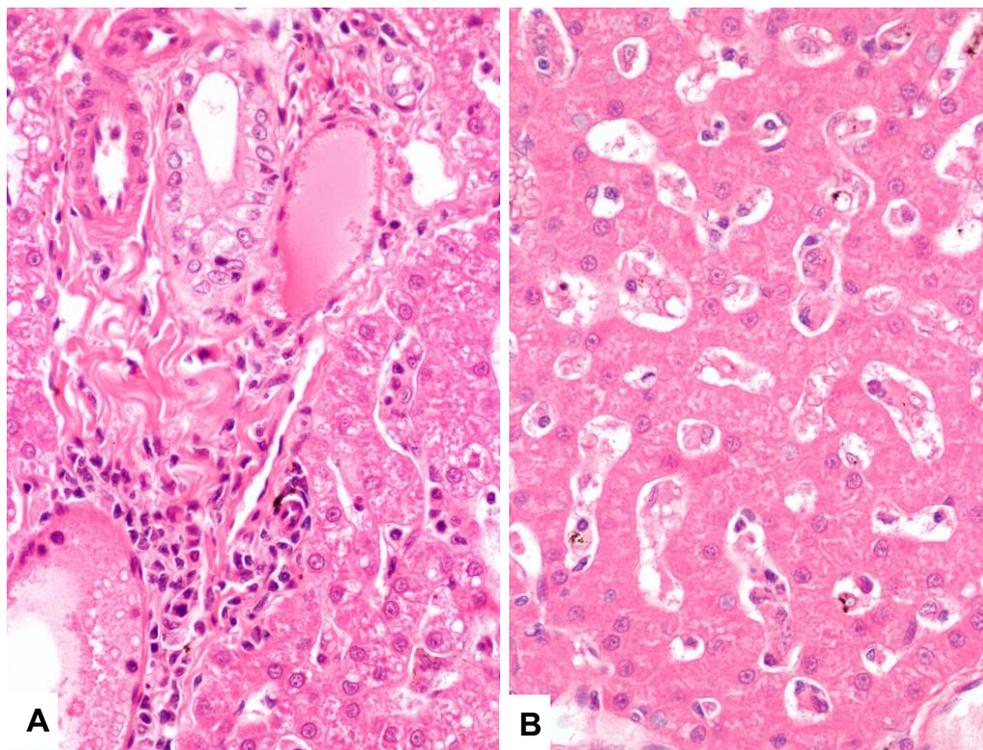


Figura 3. Fotomicrografia de tecido hepático dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Inflamação portal linfoplasmocitária discreta (HE, aumento de 200x) (B) Hiperplasia e hipertrofia de Kupffer (HE, aumento de 400x).

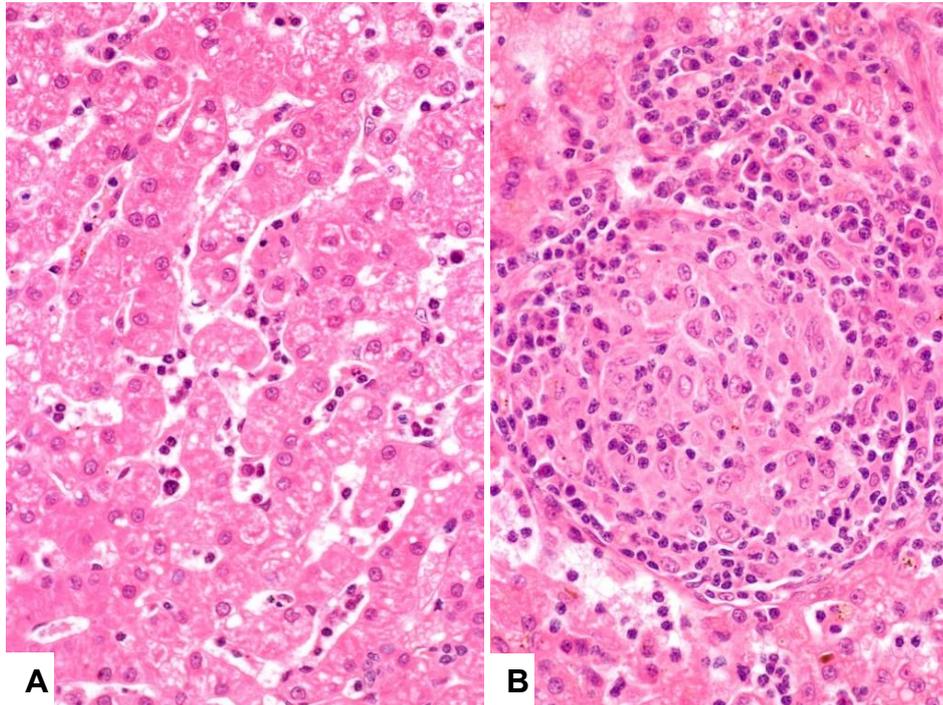


Figura 4. Fotomicrografia de tecido hepático dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Linfocitose intrassinusoidal (HE, aumento de 200x) (B) Granuloma portal (HE, aumento de 200x).

5.2.2 Baço

Foram avaliados baços dos 58 cães. Conforme a classificação proposta por Santana et al (2008), os baços foram categorizados conforme a organização dos folículos esplênicos em: bem organizados ou tipo 1, moderadamente desorganizados ou tipo 2 e amplamente desorganizados ou tipo 3 (Figura 6). As alterações esplênicas avaliadas encontram-se agrupadas na tabela 6.

Foram encontrados 22, 41% (13/58) de baços do tipo 1, 70,69% (41/58) tipo 2 e 6,90% (4/58) compatíveis com o tipo 3. Assintomáticos apresentaram 44,44% (4/9) de baços do tipo 1, 44,44% do tipo 2 (4/9) e 11,11% (1/9) do tipo 3. Sintomáticos mais frequentemente exibiram folículos tipo 2, encontrado em 75,51% (37/49) animais. O tipo 1 foi visto em 18,37% (9/49), e os do tipo 3 presentes em 6,12% dos casos (3/49) (Figura 5) Os grupos não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao tipo de folículo ($p= 0,091$).

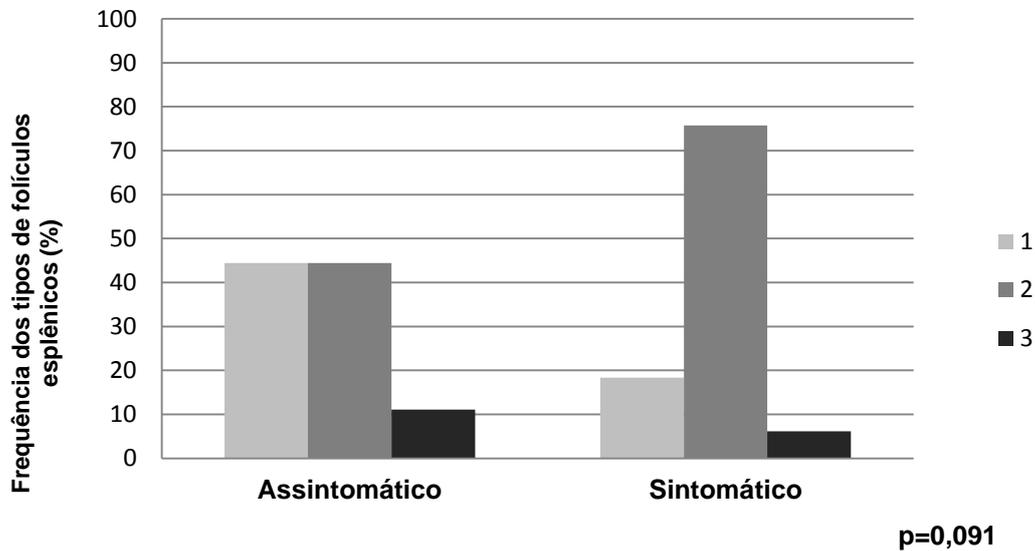


Figura 5. Frequências dos tipos de folículos esplênicos nas manifestações clínicas, segundo os mesmos critérios adotados por Santana et al, 2008.

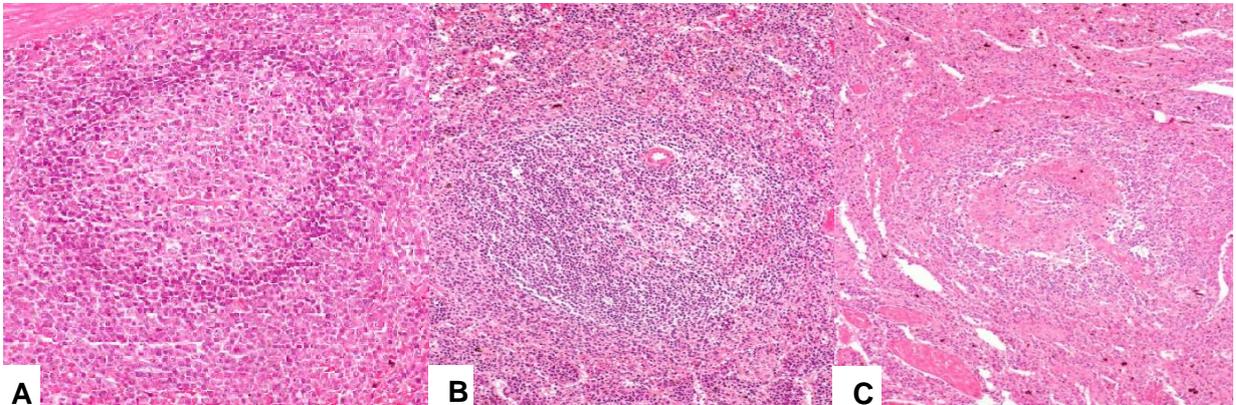


Figura 6. Grau de organização dos folículos linfoides do baço (A) Folículos tipo 1 ou bem organizado (B) Folículos tipo 2 ou levemente desorganizados (C) Folículos do tipo 3 ou tecido linfoide desorganizado.

Foi encontrado plasmocitose nos cordões em 91,38% das amostras. A alteração era discreta em 29,31% (17/58), moderada em 46,55% (27/58) e intensa em 15,52% (9/58). Assintomáticos apresentaram plasmocitose discreta (4/9, 44,44%) e moderada (5/9, 55,56%), não havendo casos de plasmocitose intensa. No grupo dos sintomáticos, foi intensa em 18,37% (9/49), moderada em 44,90% (22/49)

e discreta em 26,53% (13/49) (Figura 7). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos estudados quanto ao critério ($p= 0,461$).

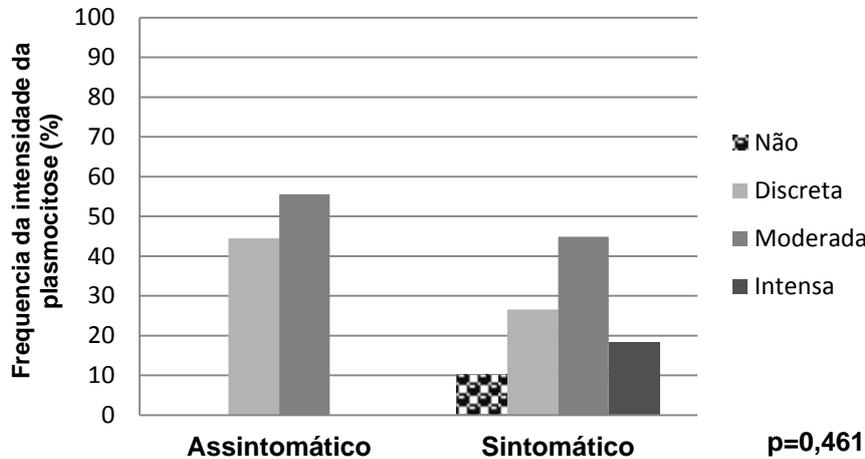


Figura 7. Frequência de intensidade da plasmocitose registrada nos cordões esplênicos nos grupos dos cães naturalmente infectados.

Megacariócitos foram visualizados nos dois grupos e estavam presentes em 79,31% (46/58) das amostras. Assintomáticos apresentaram megacariócitos mais frequentemente na intensidade discreta (4/9, 44,44%). A intensidade moderada foi vista em 33,33% (3/9,) e intensa 11,11% (1/9). Nos sintomáticos foi encontrado em discreto número em 57,14% (28/49), moderado em 14,29% (7/49) e intenso em 6,12% (3/49). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as manifestações clínicas quanto à intensidade dessas células ($p= 0,430$).

Precursos eritroides e mieloides foram notados em 6,89% (4/58) dos casos, todos sintomáticos (4/49, 8,16%). A formação de granulomas não foi encontrada dentre os casos de baço estudados.

Periesplenite foi vista em 36,21% (21/58) dos animais, todos em intensidade discreta. Desses, três (3/9, 33,33%) eram assintomáticos, enquanto 18 (18/49, 36,73%) eram sintomáticos. O tipo de infiltrado mais frequente nos casos foi o linfoplasmocitário (12/58, 20,69 %) e o linfoplasmocitário (7/58, 12,07%). Neutrófilos foram vistos de permeio às células mononucleares em 3,44% (2/58) dos casos. No grupo dos assintomáticos a infiltração foi linfoplasmocitária em 22,22 % (2/9) e linfoplasmocitária em 11,11% (1/9). Nos sintomáticos, a periesplenite foi linfoplasmocitária em 11,11% (1/9).

plasmocitária em 20,41% (10/49) e linfoplasmocitária em 12,24% (6/49). Nos parâmetros intensidade ($p=0,581$) e de tipo de infiltrado ($p=1,00$) o critério periesplenite não demonstrou diferença estaticamente significativa entre as manifestações clínicas.

Em HE, formas amastigotas foram vistas em 10,34% (6/58) dos fragmentos. No grupo dos assintomáticos foram encontradas em 11,11% (1/9). Nos sintomáticos foram observadas formas amastigotas em 10,20% (5/49). Não houve diferença estatística significantes entre os grupos quanto a presença de parasitismo no baço ($p=1,000$).

Tabela 6. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo de folículos, plasmocitose, presença de megacariócitos, tipo de infiltrado e intensidade da periesplenite nas amostras dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
	58 (100)	9 (100)	49 (100)
Tipo de folículo			
1	13 (22,41)	4 (44,44)	9 (18,37)
2	41 (70,69)	4 (44,44)	37 (75,51)
3	4 (6,9)	1 (11,11)	3 (6,12)
Plasmocitose			
Ausente	5 (8,62)	0 (0)	5 (8,62)
Discreta	17 (44,44)	4 (44,44)	13(29,31)
Moderada	27 (55,56)	5 (55,56)	22 (46,55)
Intensa	9 (15,52)	0 (0)	9 (15,52)
Megacariócitos			
Ausente	12 (20,69)	1 (11,11)	11 (22,45)
Discreta	32 (55,17)	4 (44,44)	28 (57,14)
Moderada	10 (17,24)	3 (33,33)	7 14,29
Intensa	4 (6,9)	1 (11,11)	3 (6,12)
Infiltrado periesplenite			
Linfoplasmocitária	7 (12,07)	1 (11,11)	6 (12,24)
Linfo-histioplasmocitária	12 (20,69)	2 (22,22)	10 (20,41)
Polimorfonuclear	2 (3,45)	0 (0)	2 (4,08)
Periesplenite			
Ausente	37 (63,79)	6(66,66)	31 (63,27)
Discreta	21(36,21)	3 (33,33)	18 (36,73)

Tipo de folículos $p=0,091$; Intensidade de plasmocitose $p= 0,461$; Intensidade de megacariócitos $p= 0,430$; Tipo de infiltrado periesplenite $p= 1,000$; Intensidade de periesplenite $p= 0,581$.

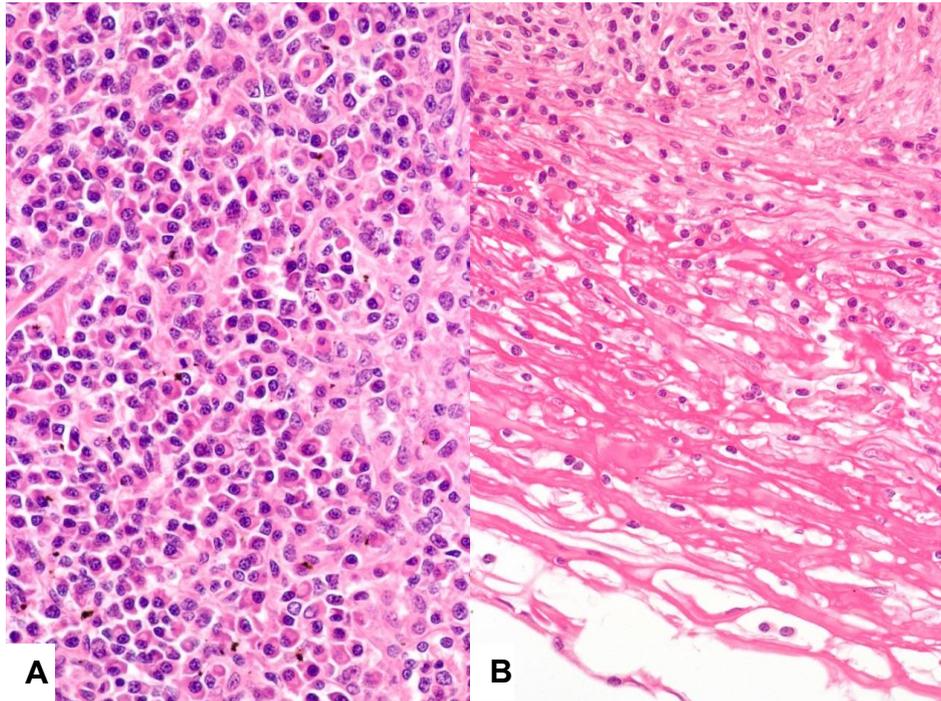


Figura 8. Fotomicrografias do baço dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Plasmocitose em cordões esplênicos (HE, aumento de 400x) (B) Periesplenite (HE, aumento de 200x).

5.2.3 Linfonodo

Foram analisados linfonodos de 56 animais, 8 assintomáticos e 48 sintomáticos.

Capsulite em linfonodos foi observada em aproximadamente 61% dos cães. O tipo de infiltrado mais frequente foi o linfo-histioplasmocitário, presente em 28,57% (16/56). Foram encontrados também na cápsula, infiltração por plasmócitos em 1,79% (1/56); composta por linfócitos e plasmócitos em 25% (14/56) e por uma infiltração mista de mononucleares e neutrófilos em 5,36% (3/56). Nos assintomáticos foi observada capsulite linfoplasmocitária (1/8, 12,50%) ou linfo-histioplasmocitária (3/8, 37,50%). Nos sintomáticos foi plasmocitária em 2,08% (1/48), linfoplasmocitária e linfo-histioplasmocitária em 27,08% (13/48), e em 6,25% (3/48) mista, formada por mononucleares e neutrófilos (Tabela 7). Não foram encontradas diferenças entre as manifestações quanto ao critério tipo de infiltrado na cápsula ($p=0,841$).

A intensidade do infiltrado encontrado na cápsula foi discreta em 50%, moderada ou intensa em 5,36% (3/56). Nos assintomáticos foi discreta em metade dos cães do grupo (4/8). Os sintomáticos apresentaram capsulite discreta em 50%, e moderada e intensa em 6,25% (3/56) (Tabela 7). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,893$).

Hiperplasia de folículos foi observada em aproximadamente 16% das amostras. Nos assintomáticos 37,50% (3/8) dos casos exibiam folículos hiperplásicos e nos sintomáticos encontrados em 12,50% (6/48) (Tabela 7). Atrofia de folículos foi observada em um animal assintomático. Quanto ao critério hiperplasia de folículos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,108$).

Tabela 7. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo de infiltrado e intensidade de capsulite e hiperplasia de folículos nas amostras dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
	56(100)	8(100)	48(100)
Tipo de infiltrado capsulite			
Linfo-histioplasmocitário	16 (28,57)	3 (37,5)	13 (27,08)
Plasmocitário	1 (1,79)	0 (0)	1 (2,08)
Linfoplasmocitário	14 (25)	1 (12,5)	13 (27,08)
Mista	3 (5,36)	0 (0)	3 (6)
Intensidade capsulite			
Ausente	22 (29,29)	4 (50)	18 (37,5)
Discreta	28 (50)	4 (50)	24 (50)
Moderada	3 (5,36)	0 (0)	3 (6,25)
Intensa	3 (5,36)	0 (0)	3 (6,25)
Hiperplasia de folículos			
Sim	9 (16,07)	3 (37,5)	6 (12,5)
Não	47 (83,93)	5 (62,5)	42 (66,67)

Tipo de infiltrado capsulite $p=0,841$; intensidade do infiltrado capsulite $p=0,893$; hiperplasia de folículos $p=0,108$.

Seios subcapsulares dilatados foram observados em aproximadamente 59% das amostras. A dilatação era discreta (28/56, 50,00%) ou moderada (5/56, 8,93%). Nos animais assintomáticos foi vista de forma discreta em 75% (6/8) dos casos e moderada em 12,50% (1/8). No grupo dos sintomáticos foi observada em

intensidade discreta em 45,83% (22/48) e moderada em 8,33%(4/48). Não houve diferença estatisticamente significativa no critério dilatação dos seios subcapsulares entre os grupos estudados ($p=0,166$).

Os seios medulares encontravam-se dilatados em 64,29% das amostras. A intensidade moderada foi vista na maioria dos casos, presente em 32,14%. A forma discreta foi observada em 23,21% (13/56) e intensa em 8,93% (5/56). Nos cães assintomáticos foi encontrada de forma discreta ou intensa em 12,50% (1/8) e moderada em 62,50% (5/8). No grupo dos sintomáticos, a alteração foi discreta em 25% (12/48), moderada em 27,08% e intensa em 8,33% (4/48). Em relação à dilatação dos seios medulares diferenças estatisticamente não foram verificadas ($p=0,167$).

Tabela 8. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros dilatação do seio subcapsular e medular nas amostras de linfonodo dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
	56 (100)	8 (100)	48 (100)
Dilatação do seio subcapsular			
Ausente	23 (41,07)	1 (12,5)	22 (45,83)
Discreta	28 (50)	6 (75)	22 (45,83)
Moderada	5 (8,93)	1 (12,5)	4 (8,34)
Dilatação do seio medular			
Ausente	20 (35,71)	1 (12,5)	19 (39,58)
Discreta	13(23,21)	1 (12,5)	12 (25)
Moderada	18 (32,14)	5 (62,5)	13 (27,08)
Intensa	5 (8,93)	1 (12,5)	4 (8,33)

Intensidades de dilatação do seios subcapsulares $p=0,166$; de dilatação do seios medulares $p=0,167$.

A histiocitose dos seios subcapsulares foi vista em 82,14% dos animais. A intensidade discreta predominava e estava presente em 69,64% (39/56) dos casos. Dilatação moderada foi encontrada em 7,14% (4/56) e a intensa em 5,36% (3/56) das amostras. Nos assintomáticos foi observada apenas em discreta intensidade (7/8, 14,29%). Nos sintomáticos, a alteração foi discreta em 66,67% (32/48), moderada em 8,33% (4/48) e intensa em 6,25% (3/48). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no parâmetro ($p=1,000$).

Nos seios medulares foi encontrada histiocitose em 73,21% dos casos. A intensidade discreta foi observada em 28,57% (16/56) a moderada em 35,42%

(21/56) e a intensa em 7,14%(4/56) dos cães. No grupo dos assintomáticos foi encontrada discreta (3/8, 37,50%) ou moderada (4/8, 50%) histiocitose. Nos sintomáticos foi discreta em 27,08% (13/48) moderada em 35,42% (17/35) e intensa em 8,33% (4/48) dos animais. Em relação à histiocitose de seios medulares não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as manifestações clínicas ($p=0,756$).

Tabela 9. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros histiocitose dos seios subcapsular e medular nas amostras de linfonodo dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra	Assintomáticos	Sintomáticos
	n (%)	n (%)	n (%)
	56 (100)	8 (100)	48 (100)
Histiocitose do seio subcapsular			
Ausente	10 (17,86)	1 (12,5)	9 (18,75)
Discreta	39 (69,64)	7 (87,5)	32 (66,67)
Moderada	4 (7,14)	0 (0)	4 (8,33)
Intensa	3 (6,25)	0 (0)	3 (6,25)
Histiocitose do seio medular			
Ausente	15 (26,79)	1 (12,5)	14 (29,17)
Discreta	16 (28,57)	3 (37,5)	13 (27,08)
Moderada	21 (37,5)	4 (19,05)	17 (35,42)
Intensa	4 (7,14)	0 (0)	4 (8,33)

Intensidade de histiocitose do seio subcapsulares $p=1,000$; intensidade de histiocitose do seios medulares $p=0,756$.

Nos cordões linfáticos foi encontrado plasmocitose em cerca de 91% das amostras. Foi discreta em 14,29% (8/56), moderada em 35,71% (20/56) e intensa em 41,07% (23/56) nos casos analisados. A intensidade da alteração nos assintomáticos foi discreta e moderada em 25% (2/8) e intensa em 37,50%. Nos sintomáticos foram observados 12,50% (6/48) de casos com plasmocitose discreta, 37,50% (18/48) moderada e 41,67% intensa (Figura 9). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no parâmetro intensidade de plasmocitose nos cordões ($p=0,645$).

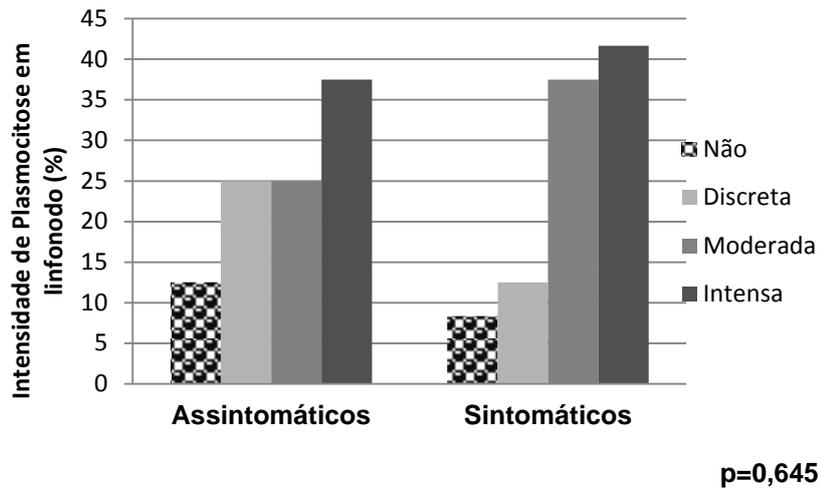


Figura 9. Frequência das Intensidades de plasmocitose em linfonodos nos grupos dos cães naturalmente de área endêmica do município de Jequié-Ba.

Espessamento dos cordões com aumento numérico de células foi observado em 21,43% dos cães. Foi de discreta intensidade em 10,71% (6/56), moderada em 8,93% (5/56). Nos assintomáticos foi observado espessamento discreto ou intenso em 12,50% (1/8). Nos sintomáticos foi discreto ou moderado em 10,42% (5/48). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto ao espessamento dos cordões ($p=0,202$).

Tabela 10. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros plasmocitose e espessamento de cordões nas amostras de linfonodo dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
Plasmocitose			
Ausente	5 (8,93)	1 (12,5)	4 (8,33)
Discreta	8 (14,29)	2 (25)	6 (14,29)
Moderada	20 (35,71)	2 (25)	18 (37,50)
Intensa	23 (41,07)	3 (37,5)	20 (41,07)
Espessamento de cordões			
Ausente	44 (78,57)	6 (75)	38 (78,57)
Discreta	6 (10,71)	1 (12,5)	5 (10,42)
Moderada	5 (8,93)	0 (0)	5 (10,42)
Intensa	1 (1,79)	1 (12,5)	0 (0)

Intensidade de plasmocitose $p=0,645$; Intensidade de espessamento de cordões $p=0,202$.

Formas amastigotas foram vistas em aproximadamente 16% dos cães. Nos assintomáticos foram observadas em 22,22% (2/8) e nos sintomáticos em 14,58% (7/48).

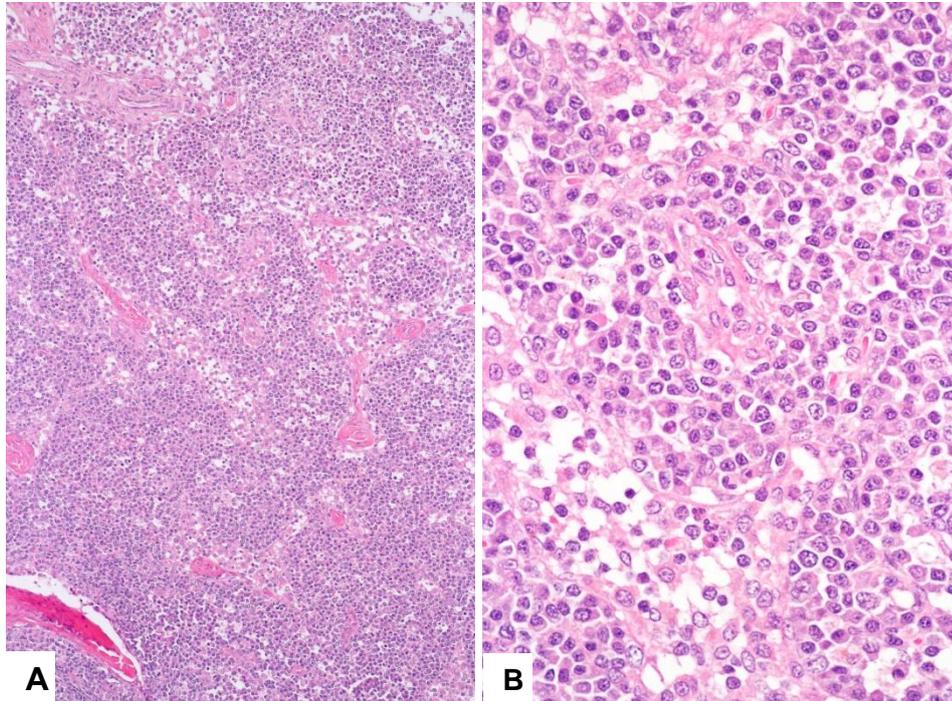


Figura 10. Fotomicrografias de linfonodo dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Espessamento em cordões (HE, aumento de 100x) (B) Plasmocitose em cordões (HE, aumento de 400x).

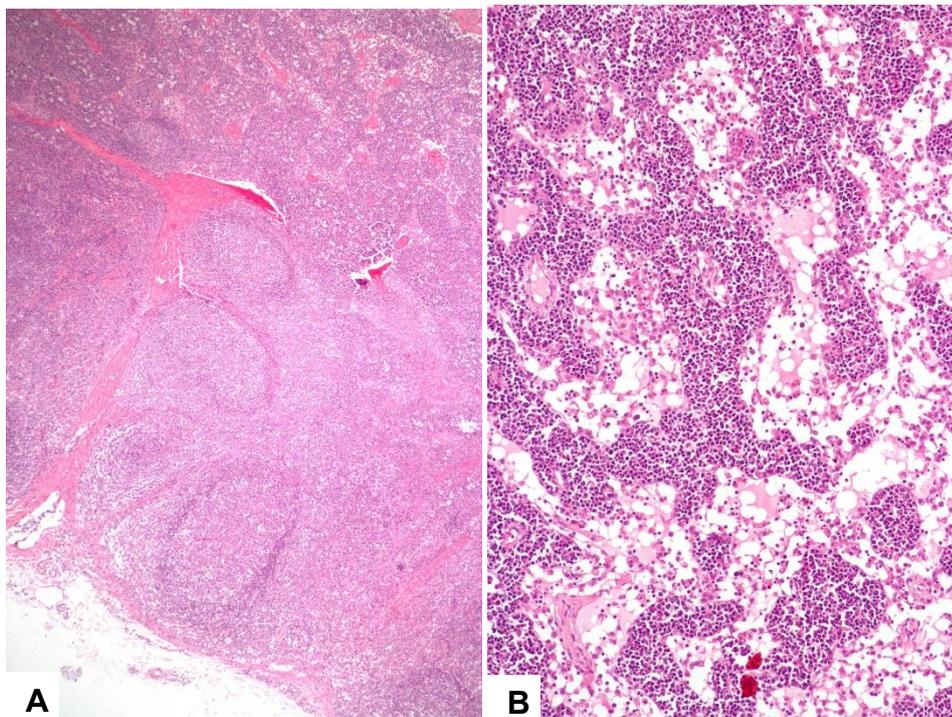


Figura 11. Fotomicrografias de linfonodo dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Hiperplasia de folículos (HE, aumento de 100x) (B) Dilatação dos seios medulares (HE, aumento de 200x).

5.2.4 Pele

Foram coletados fragmentos de pele das orelhas de 53 cães. A derme dos cães era a porção mais acometida da pele por alterações. Em 94,34% (50/53) dos casos foi notado algum grau de inflamação na derme. A inflamação era discreta em 11,32% (6/53), moderada em (37/53) e intensa em (8/53). Todos assintomáticos apresentaram inflamação na derme. A intensidade do infiltrado foi discreta em 87,50% (7/8) e moderada em 12,50% (1/8), sem a presença do padrão intenso. No grupo dos sintomáticos, foi em discreta em 71,11% (32/45), moderada em 17,78% (8/45) e intensa em 4,44% (2/45) (Tabela 11). Não foram encontradas diferenças entre os grupos para intensidade de inflamação ($p=1,000$).

Infiltrado na derme com localização perianexial, perivascular ou a combinação de perianexial e perivascular foram encontradas em 54,72% (29/53) das amostras. Em 45,28% (24/53) a inflamação situava-se principalmente perianexial, e em 3,77% (2/53) era perivascular e ainda em 5,66% (3/53) a combinação de perianexial e perivascular. Assintomáticos tiveram concentração inflamatória perianexial (7/8, 87,50%) ou sem localização preferencial do infiltrado (1/8, 12,50%). Em sintomáticos, foi perianexial em 37,78% (17/45), perivascular em 44,44% (2/45), perianexial e perivascular em 6,67% (3/45) e sem localização preferencial em 51,11% (23/45) (Tabela 11). Quanto à localização, os grupos não demonstraram diferenças estatísticas significantes ($p=0,097$).

A distribuição do infiltrado na derme foi focal em 11,32% (6/53), multifocal em 69,81% (37/53) e difusa em 15,08% (8/53). Nos assintomáticos foi multifocal em 7 (7/8, 87,50%) e em um caso foi difusa (1/8, 12,50%). O grupo dos sintomáticos, demonstrou o padrão de distribuição multifocal em 66,67% (30/45), focal em 13,33% (6/45) e difuso em 15,56% (7/45) (Tabela 11). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ente as manifestações clínicas no parâmetro distribuição do infiltrado ($p=0,874$).

Na derme dos cães foi encontrada inflamação principalmente por mononucleares. O infiltrado foi linfoplasmocitário em 71,70% (38/53), linfoplasmocitário em 16,98% (9/53), plasmocitário em 1,89% (1/53) e linfocitário

em 3,77% (2/53) (Tabela 11). Neutrófilos foram vistos de permeio às células mononucleares em cerca de 18,87% e eosinófilos em 5,66 % dos casos.

Nos assintomáticos a inflamação na derme era linfoplasmocitária (7/8, 87,50%) ou linfo-histioplasmocitária. (1/8, 12,50%). No grupo dos sintomáticos foi linfoplasmocitária em 68,89% (31/45), linfo-histioplasmocitária em 17,78% (8/45), linfocitária em 4,44% (2/45) e plasmocitária em 2,22% (1/45) (Tabela 11). Em dois cães foram encontrados granulomas na derme, de maneira isolada, cada um com apenas um granuloma no fragmento. Em um dos casos, o granuloma estava localizado adjacente à glândula sebácea, em outro, sem proximidade a qualquer estrutura e com características de granuloma por corpo estranho. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos no critério tipo de infiltrado ($p=1,00$).

Tabela 11. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo de infiltrado, intensidade, distribuição e localização preferencial da inflamação da derme nas amostras dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
	53 (100)	8 (100)	45 (100)
Tipo infiltrado derme			
Linfoplasmocitária	38 (71,7)	7 (87,5)	31 (68,89)
Linfo-histioplasmocitária	9 (16,98)	1 (12,5)	8 (17,78)
Plasmocitária	1 (1,89)	0 (0)	1 (2,22)
Linfocitária	2 (3,77)	0 (0)	2 (4,44)
Intensidade do infiltrado			
Ausente	3 (5,66)	0 (0)	3 (5,66)
Discreta	39 (73,58)	7 (87,5)	32 (71,11)
Moderada	9 (16,98)	1 (12,5)	8 (17,78)
Intensa	2 (3,77)	0 (0)	2 (4,44)
Distribuição do infiltrado			
Focal	6 (11,32)	0 (0)	6 (13,33)
Multifocal	37 (69,81)	7 (87,5)	30 (66,67)
Difusa	8 (15,09)	1 (12,5)	7 (15,56)
Localização infiltrado			
Sem localização preferencial	24 (45,28)	1 (12,5)	23 (51,11)
Perianexial	24 (45,28)	7 (87,5)	17 (37,78)
Perivascular	2 (3,77)	0 (0)	2 (4,44)
Perianexial e perivascular	3 (5,66)	0 (0)	3 (6,67)

Tipo de infiltrado $p=0,798$; intensidade do infiltrado $p= 1,000$; distribuição do infiltrado $p=0,874$; localização do infiltrado $p= 0,097$.

A epiderme de 20,75% (11/53) dos cães revelou processo inflamatório em algum grau. As lesões foram discretas em 5,66% (3/53), moderadas em 11,32% (6/53) e intensas em 3,77% (2/53). Na epiderme foram observadas pústulas e regiões ulceradas de extensão variável, formação de crostas e áreas de hiperplasia e hiperqueratose. Dos assintomáticos, um cão exibiu processo inflamatório moderado em região de epiderme (1/8, 12,50%), os outros 10, todos eram do grupo dos sintomáticos. Nos sintomáticos, a inflamação era discreta em 6,67% (3/45), moderada em 11,11% (5/45) e intensa em 4,44% (2/45). Diferenças estatisticamente significantes não foram vistas com relação à intensidade de inflamação na epiderme entre as manifestações clínicas ($p=1,000$).

Amastigotas de *Leishmania* foram vistas em 9,43% (5/53) dos tecidos analisados. Presença do parasito foi constatado em 2 assintomáticos (2/8, 25%) e 3 sintomáticos (3/45, 6,67%). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos nas análises realizadas para o critério ($p=0,159$).

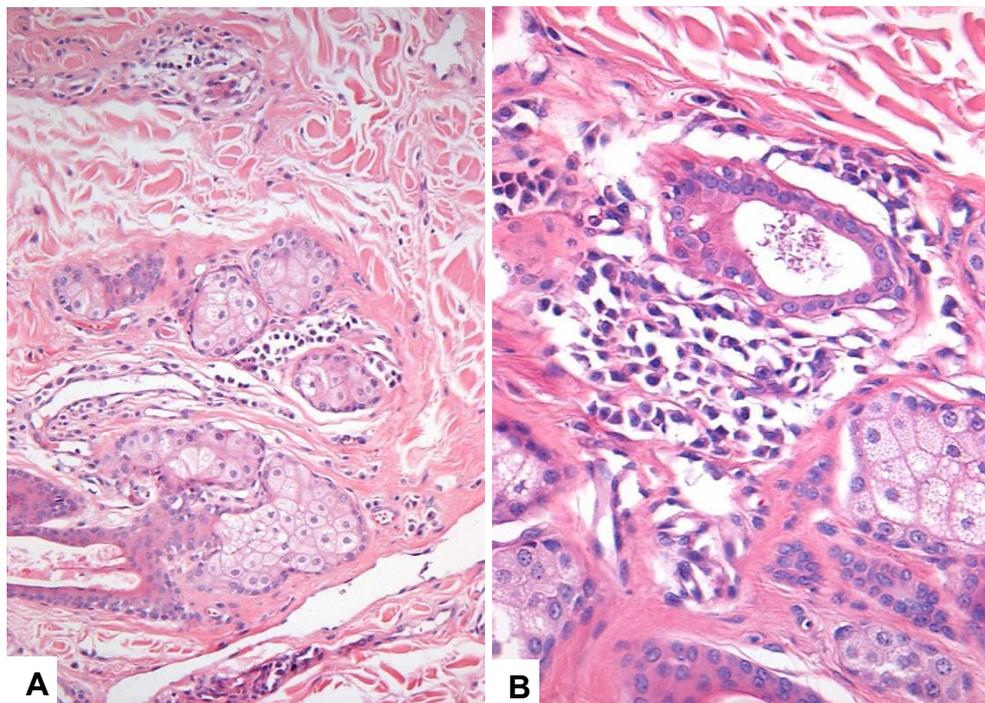


Figura 12. Fotomicrografia da pele de cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Infiltrado inflamatório discreto perianexial (HE, aumento de 200x) (B) Infiltrado linfoplasmocitário perianexial discreto (HE, aumento de 400x).

5.2.5 Intestino

Foram coletados fragmentos de intestino delgado de 50 cães. Na população, numa visão ampla, as alterações, quando existiam, eram discretas e focais. Das amostras colhidas, seis pertenciam ao grupo dos assintomáticos e 44 dos sintomáticos. Nas análises, dois (2/50-4%) animais exibiram helminto nematoide no lúmen intestinal, sendo um do grupo dos assintomáticos e outro dos sintomáticos.

Apenas o grupo dos sintomáticos revelaram demais alterações. Discreta hiperplasia reacional linfoide em placas de Payer foi verificada em 3 casos (3/44-6,82%). Inflamação intramucosa, intensa e focal, com predomínio macrofágico foi visualizada em um animal (1/44-2,27%) ($p=1,000$). Em um fragmento foi visto discreta plasmocitose no eixo das vilosidades (1/44-2,27%) ($p=1,000$).

Animais assintomáticos não revelaram estruturas sugestivas de formas amastigotas de *Leishmania sp.* Somente um cão sintomático apresentou material compatível com o parasito no corte do segmento avaliado ($p=1,000$). Não foram demonstradas diferenças estatísticas entre as manifestações clínicas na abordagem do órgão pelo teste exato de Fisher ao nível de significância de $p<0,05$.

Tabela 12. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo e intensidade de infiltrado encontrado na mucosa, plasmocitose e presença de amastigotas de *Leishmania* nas amostras de intestinos dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra	Assintomáticos	Sintomáticos
	n (%)	n (%)	n (%)
	50(100)	6 (100)	44 (100)
Tipo de infiltrado			
Macrofágico	1 (2,00)	0 (0)	1 (2,27)
Intensidade do infiltrado			
Ausente	49 (98)	6 (100)	43 (97,73)
Intenso	1 (2,00)	0 (0)	1 (2,27)
Plasmocitose			
Ausente	49 (98)	6 (100)	43 (97,73)
Discreta	1 (2,00)	0 (0)	1 (2,27)
<i>Leishmania</i>			
Não	49 (98)	6 (100)	43 (97,73)
Sim	1 (2,00)	0 (0)	1 (2,27)

Tipo de infiltrado $p= 1,000$; intensidade do infiltrado $p= 1,000$; plasmocitose $p= 1,000$; *Leishmania* $p= 1,000$.

5.2.6 Pulmões

Pulmões de 58 cães foram submetidos às análises histopatológicas. Alterações foram frequentemente ausentes e, quando presentes, eram brandas, com a maior parte dos casos mantendo a arquitetura normal do órgão, sem comprometimentos maiores.

Infiltrado inflamatório peribronquiolar foi encontrado em cerca de 85% dos indivíduos (49/58-84,48%). Esse infiltrado foi discreto em 72,41% (42/58) (Figura 14), moderado em 10,34% (6/58) e intenso em 1,72% (1/58). Nos assintomáticos foi discreto em 55,56% (5/9), moderado em 33,33% (3/9) e não observados casos intensos. Nos sintomáticos foi predominantemente discreto, presente em 75,51% (37/49), moderado em 6,12% (3/49) e intenso em 2,04% (1/49) (Figura 13). Quanto à intensidade do infiltrado não foram vistas diferenças entre os grupos ($p=0,129$).

O tipo de infiltrado peribronquiolar que predominava entre as amostra foi o linfoplasmocitário (30/58-51,72%) e o linfo-histioplasmocitário (14/58-24,14%). Em menor proporção, foram vistos também o plasmocitário (1/49, 1,72%), o neutrofílico (1/49, 1,72%), o linfo-histioplasmocitário com focos com neutrófilos (1/49, 1,72%) e o misto, com iguais proporções de neutrófilos e mononucleares (2/58, 3,45%). Nos assintomáticos, o padrão linfoplasmocitário e o linfo-histioplasmocitário representaram 33,33% (3/9) dos casos cada e em 22,22% (2/9) um infiltrado misto, composto por mononucleares e neutrófilos estava presente.

Nos sintomáticos, infiltrado peribronquiolar linfoplasmocitário foi visto em 55,10% (27/49), linfo-histioplasmocitário em 22,45% (11/49), plasmocitário em 2,04% (1/49), linfo-histioplasmocitário com focos de neutrófilo em 2,04% (1/49), o neutrofílico em 2,04% (1/49). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as manifestações clínicas quanto ao tipo de infiltrado peribronquiolar ($p=0,454$).

Em 12,07% dos casos foram registrados broncopneumonia em intensidades variáveis. Nos assintomáticos, a broncopneumonia foi presente em 11,11% (1/9) de forma discreta em e 11,11% (1/9) intensa. Nos sintomáticos, foi discreta em 4,08%

(2/49) e moderada em 6,12% (3/49) dos cães. Em um animal sintomático foi encontrado discreto espessamento multifocal de septo. Não foram demonstradas diferenças estatísticas quanto à intensidade da alteração ($p=0,198$) nos grupos.

Tabela 13. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo e intensidade do infiltrado peribronquiolar nas amostras de pulmão dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra	Assintomáticos Sintomáticos	
	n (%)	n (%)	n (%)
	58(100)	9 (100)	49 (100)
Tipo infiltrado peribronquiolar			
Linfoplasmocitária	30 (51,72)	3 (33,33)	27 (55,10)
Linfo-histioplasmocitária	14 (24,14)	3 (33,33)	11 (22,45)
Plasmocitária	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Mista	2 (3,45)	2 (22,22)	0 (0)
Mononuclear com focos neutrófilos	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Neutrófila	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Intensidade infiltrado peribronquiolar			
Ausente	9 (15,52)	1 (11,11)	8 (16,33)
Discreto	42 (72,41)	5 (55,56)	37 (75,51)
Moderado	6 (10,34)	3 (33,33)	3 (6,12)
Intenso	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)

Tipo de infiltrado peribronquiolar $p= 0,454$; Intensidade do infiltrado peribronquiolar $p= 0,129$.

Hemorragia foi encontrada em 3,54% (2/58) dos cães. Nos assintomáticos, a alteração foi ausente nos fragmentos de tecido analisados. Nos sintomáticos, hemorragia estava representada em cerca de 4% (2/49, 4,08%) das amostras. A intensidade era discreta em 2,04% (1/49) e intensa em 2,04% (1/49).

Edema foi visualizado em 6,9% (4/58) dos casos. Foi presente de forma discreta em 1,72% (1/58), moderada em 1,72% (1/58) e intensa em 3,54% (2/58). Em assintomáticos, o edema foi discreto ou intenso com um caso em cada intensidade (1/9-11,11%). Nos sintomáticos, a alteração foi moderada em 2,04% (1/49) e intensa em 2,04% (1/49). Discreta antracose esteve presente em 62,52% e moderada em 3,45% das amostras.

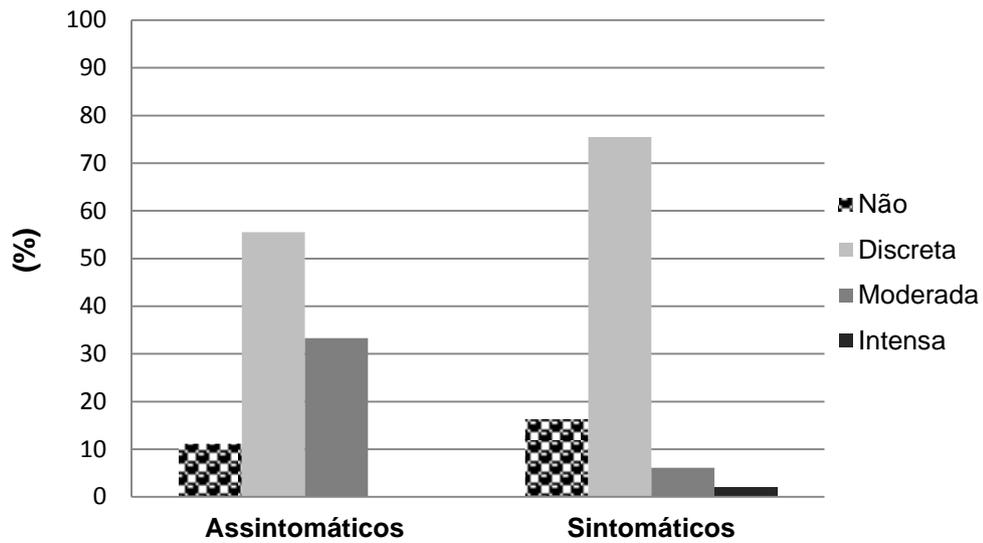


Figura 13. Intensidade do infiltrado peribronquiolar registrado nos casos em assintomáticos e sintomáticos.

Tabela 14. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros broncopneumonia, edema e hemorragia nas amostras de pulmão dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

	Amostra	Assintomáticos	Sintomáticos
Critério	n (%)	n (%)	n (%)
	58(100)	9 (100)	49 (100)
Broncopneumonia			
Ausente	51 (87,93)	7(77,78)	44 (89,80)
Discreta	3 (5,17)	1 (11,11)	2(4,08)
Moderada	3 (5,17)	0 (0)	3 (6,12)
Intensa	1 (1,72)	1 (11,11)	0 (0)
Hemorragia			
Ausente	56 (96,55)	9 (100)	47 (95,92)
Discreta	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Intensa	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Edema			
Ausente	54 (93,10)	7 (77,78)	47 (95,92)
Discreta	1 (1,72)	1 (11,11)	0 (0)
Moderada	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Intensa	2 (3,54)	1 (11,11)	1 (2,04)

Broncopneumonia p= 0,198; hemorragia p= 1,000; edema p= 0,110.

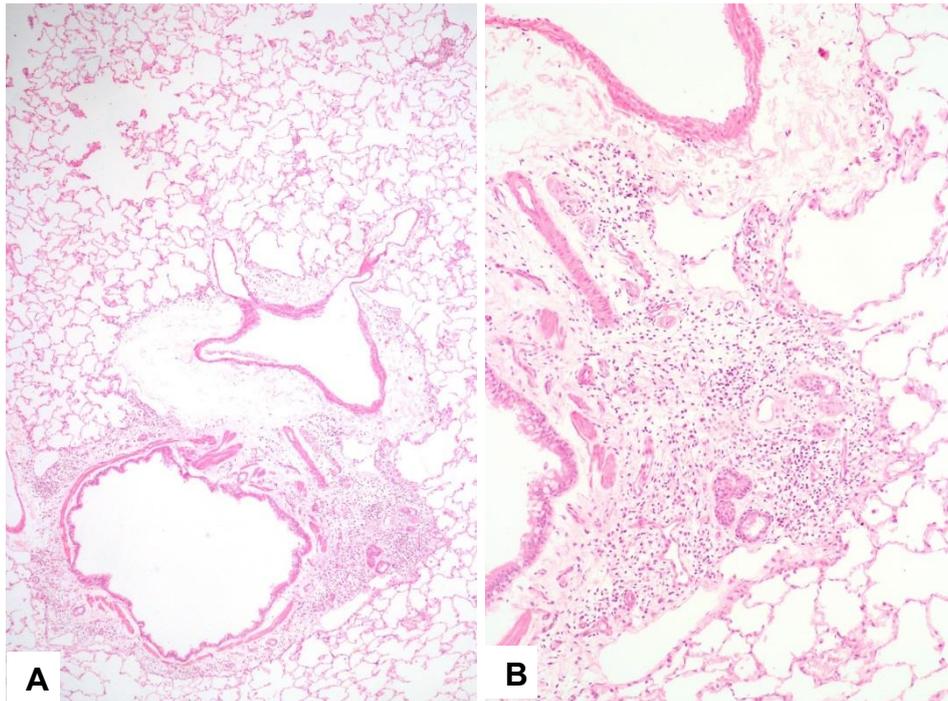


Figura 14 . Fotomicrografia dos pulmões de cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Infiltrado peribronquiolar discreto, alvéolos com características normais (HE, aumento 100X) (B) infiltrado peribronquiolar discreto (HE, aumento 200X).

5.2.7 Rins

Fragmentos renais dos 58 cães foram avaliados. No interstício renal foi encontrado infiltrado inflamatório em 87,93% (51/58). A inflamação foi discreta em 62,07% (36/58), moderada em 18,97% (11/58) e intensa em 6,90% (4/58). Nos assintomáticos foi de intensidade discreta em 66,67% (6/9), moderada em 11,11% (1/9) e intensa em 11,11% (1/9). No grupo dos sintomáticos foi vista de forma discreta em 61,22% (30/49), moderada em 20,41% (10/49) e intensa em 6,12% (3/49) (Figura 15) (Tabela 15). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes relacionadas à intensidade do infiltrado no interstício renal ($p=0,869$).

O infiltrado presente no interstício era constituído principalmente por mononucleares. Nefrite intersticial plasmocitária foi vista em 24,14% (14/58) e composta por linfócitos e plasmócitos encontrada em 56,90% (33/58), linfoplasmocitária em 5,17% (3/58) e uma infiltração mista de mononucleares composta por macrófagos, linfócitos e plasmócitos com neutrófilos de permeio encontrada em 2,04 (1/58). Nos assintomáticos, a nefrite foi do tipo plasmocitária em

11,11% (1/9) e linfoplasmocitária em 77,78% (7/9). No grupo dos sintomáticos, foram encontrados infiltrados dos tipos plasmocitário (13/49, 26,53%), linfoplasmocitário (26/49, 53,06%), linfo-histioplasmocitário (3/49, 6,12%) e linfo-histioplasmocitário com por neutrófilos permeados (1/49, 2,04%) (Tabela 15). Não houve diferença entre os grupos quanto ao tipo de infiltrado presente nas amostras ($p=0,792$).

Em cerca de 14% (8/58) a nefrite intersticial era concentrada periglomerular. Nos assintomáticos foi vista infiltração concentrada periglomerular em 22,22% (2/9) e nos sintomáticos, encontrada em 12,24% (6/49). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,597$).

Quanto à distribuição do infiltrado, foi encontrado multifocal em 84,48% (49/58) das amostras e focal em 3,45% (2/58). Nos assintomáticos foi focal em 11,11% e multifocal em 77,78% (7/9). Nos sintomáticos, foi focal em 2,04% (1/49) e multifocal em 85,71% (42/49). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no critério distribuição do infiltrado ($p=0,341$).

A pelve renal estava representada em 55 casos. Pielite foi vista em 72,73% dos cães. O padrão de inflamação linfoplasmocitário estava presente em 27 cães (27/55, 49,09%). Foram encontrados também na pelve, infiltrados dos tipos linfocitário (4/55, 7,27%), plasmocitário (2/55, 3,64%), linfomacrofágico (1/55, 1,82%), linfo-histioplasmocitário (2/55, 3,64%) e um infiltrado misto de mononucleares e neutrófilos (4/55, 7,27%). No grupo dos assintomáticos, pielite linfoplasmocitária foi encontrada em 75% (6/8) e linfo-histioplasmocitária em 12,50% (1/8). Nos sintomáticos, o infiltrado linfoplasmocitário predominou nas amostras e foi visto em 44,68% (21/47), o linfo-histioplasmocitário em 2,13% (1/47), o plasmocitário em 4,26% (2/47), o linfocitário encontrado em 8,51% (4/47) e o misto de mononucleares e neutrófilos verificado em 8,51% (4/47) dos casos. Não foram observadas diferenças entre os grupos no parâmetro tipo de infiltrado ($p=0,489$).

Em relação à intensidade do infiltrado encontrado na pelve renal, foi discreta em 30,91% (17/55), moderada em 32,73% (18/55) e intensa em 9,09% (5/55). No grupo dos assintomáticos foi discreta e moderada em 37,50% (3/8) dos casos e intensa em 12,50% (1/8). Nos sintomáticos a intensidade foi vista de forma discreta em 29,79% (14/47), moderada em 37,50% (15/47) e intensa em 8,51% (4/47) das

amostras (Tabela 16). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao critério intensidade de inflamação na pelve ($p=0,704$).

Cerca de 35% dos animais apresentaram alteração glomerular (Figura 16). Glomerulonefrite membranoproliferativa foi encontrada em 20,69% (12/58) dos casos, glomerulonefrite membranosa vista em 10,34% (6/58) e a proliferativa em 3,45% (2/58). No grupo dos assintomáticos foram encontrados os tipos membranoproliferativa e membranosa em 11,11% (1/9). Nos sintomáticos foi encontrada a forma membranoproliferativa em 22,45% (11/47), membranosa em 10,20% (5/49) e proliferativa em 4,08% (2/49) (Tabela 15). Não houve diferença estatisticamente significativa no critério avaliado ($p=0,897$).

Tabela 15. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo, intensidade, distribuição e concentração periglomerular de infiltrado de nefrite intersticial e tipos de glomerulonefrite verificados nas amostras de rins dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
	58(100)	9 (100)	49 (100)
Tipo de infiltrado nefrite			
Linfoplasmocitário	33 (56,90)	7 (77,78)	26 (53,06)
Linfo-histioplasmocitário	3 (5,17)	0 (0)	3 (6,12)
Plasmocitário	14 (24,14)	1 (11,11)	13 (26,53)
Linfo-histioplasmocitário/neutrófilos	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Intensidade do infiltrado			
Ausente	7 (12,07)	1 (11,11)	6 (12,24)
Discreto	36 (62,07)	6 (66,67)	30 (61,22)
Moderado	11 (18,97)	1 (11,11)	10 (20,41)
Intenso	4 (6,90)	1 (11,11)	3 (6,12)
Distribuição nefrite			
Focal	2 (3,45)	1 (11,11)	1 (2,04)
Multifocal	49 (84,48)	7 (77,78)	42 (85,71)
Concentração do infiltrado nefrite			
Periglomerular	8 (13,79)	2 (22,22)	6 (12,24)
Glomerulonefrite			
Ausente	38 (65,52)	7 (63,27)	11 (22,45)
Membranoproliferativa	12 (20,69)	1 (11,11)	11 (22,45)
Membranosa	6 (10,34)	1 (11,11)	5 (10,2)
Proliferativa	2 (3,45)	0 (0)	2 (4,08)

Tipo de infiltrado nefrite $p=0,792$; intensidade do infiltrado nefrite $p=0,869$; distribuição nefrite $p=0,341$; concentração do infiltrado nefrite $p=0,597$; tipos de glomerulonefrite $p=0,897$.

Tabela 16. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros tipo e intensidade do infiltrado na pelve nas amostras de rins dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra	Assintomáticos	Sintomáticos
	n (%)	n (%)	n (%)
	55 (100)	8 (100)	47 (100)
Tipo de infiltrado pelve			
Linfoplasmocitário	27 (49,09)	6 (75)	21 (44,68)
Linfo-histioplasmocitário	2 (3,64)	1 (12,5)	1 (2,13)
Plasmocitário	2 (3,64)	0 (0)	2 (4,26)
Linfocitário	4 (7,27)	0 (0)	4 (8,51)
Misto	4 (7,27)	0 (0)	4 (8,51)
Intensidade do infiltrado pelve			
Ausente	15 (27,27)	1 (12,50)	14 (29,79)
Discreto	17 (30,91)	3 (37,5)	14 (29,79)
Moderado	18 (32,73)	3 (37,5)	15 (31,91)
Intenso	5 (9,09)	1 (12,5)	4 (8,51)

Tipo de infiltrado na pelve $p=0,489$; intensidade do infiltrado na pelve $p=0,704$.

Vacuolização em células tubulares renais foi encontrada em 56,90% (33/58) das amostras. A alteração foi discreta em 41,38% (24/58), moderada em 13,79% e intensa em 1,72% (1/58). Em relação aos assintomáticos, foi encontrada de forma discreta (3/9, 33,33%) e moderada (2/9, 22,22%). Nos sintomáticos, foi vista em intensidade discreta (21/49, 42,86%) moderada (6/49, 12,24%) ou intensa (1/49, 2,04%) (Tabela 17). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no parâmetro avaliado ($p=0,745$).

Cilindros hialinos foram observados em 15,52% (9/58) das amostras. A intensidade discreta foi encontrada em 12,07% dos casos, a moderada em 1,72% e a intensa em 1,72%. Assintomáticos apresentaram as intensidades discreta (2/9, 22,22%) e intensa (1/9, 11,11%) de cilindros hialinos (Tabela 17). No grupo dos sintomáticos foi discreta (5/47, 10,20%) ou moderada (1/49, 2,04%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,098$).

Pigmento acastanhado em células tubulares foi observado em aproximadamente 31% das amostras. Foi visto em intensidade discreta (2/9, 22,22%) ou moderada (1/9, 11,11%). Em sintomáticos foi discreta em 24,49%

(12/49) e moderada em 6,12% (3/49) (Tabela 17). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,841$). Formas amastigotas foram vistas em 6 animais, todos sintomáticos (6/49, 12,24%).

Tabela 17. Frequências obtidas nas análises dos parâmetros intensidades de vacuolização e pigmentos em células tubulares de células tubulares e cilindros hialinos nas amostras de rins dos cães naturalmente infectados de Jequié-Ba.

Critério	Amostra n (%)	Assintomáticos n (%)	Sintomáticos n (%)
	58(100)	9 (100)	49 (100)
Vacuolização em células tubulares			
Ausente	25 (43,10)	4 (44,44)	21(42,86)
Discreto	24 (41,38)	3 (33,33)	21(42,86)
Moderado	8 (13,79)	2 (22,22)	6 (12,24)
Intenso	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Pigmentos em células tubulares			
Ausente	40 (68,97)	6(66,67)	34 (69,39)
Discreto	14 (24,14)	2 (22,22)	12 (24,49)
Moderado	4 (6,90)	1 (11,11)	3 (6,12)
Cilindros hialinos			
Ausente	49 (84,48)	6 (66,67)	43 (87,76)
Discreto	7 (12,07)	2 (22,22)	5 (10,2)
Moderado	1 (1,72)	0 (0)	1 (2,04)
Intenso	1 (1,72)	1 (11,11)	0 (0)

Vacuolização de células tubulares $p=0,745$; pigmentos em células tubulares $p=0,841$; cilindros hialinos $p= 0,098$.

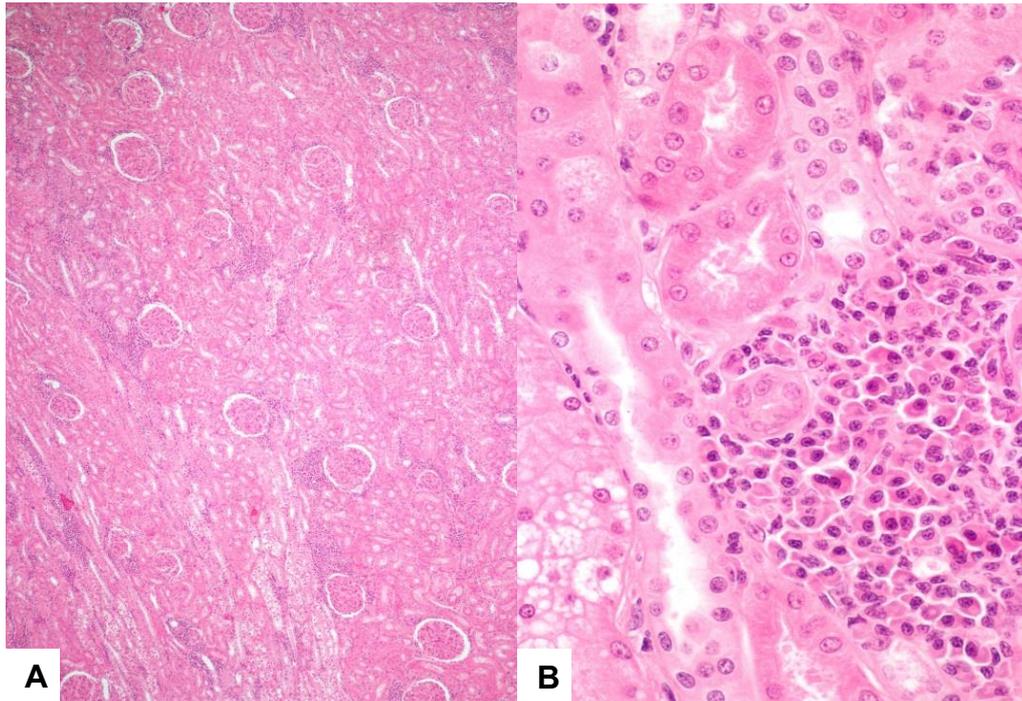


Figura 15. Fotomicrografia dos rins dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Infiltrado no interstício renal (HE, aumento de 100x). (B) Infiltrado linfoplasmocitário presente no interstício (HE, aumento de 400x).

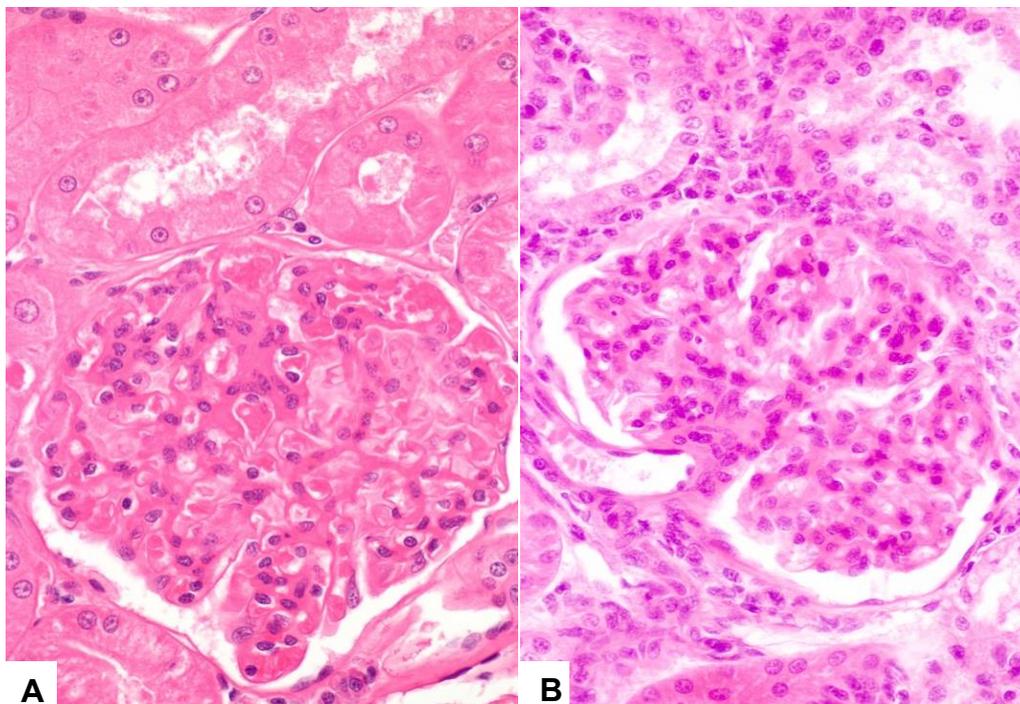


Figura 16. Fotomicrografia dos rins dos cães naturalmente infectados do município de Jequié-Ba. (A) Glomerulonefrite membranoproliferativa (B) Glomerulonefrite proliferativa (HE, aumentos de 400x).

5.3 IMUNOISTOQUÍMICA E CARGA PARASITÁRIA

5.3.1 Fígado

Nos 14 casos de fígado estudados, foi encontrado ao menos um parasito em 12 deles. Os resultados de contagem de unidade de *Leishmania* nas imagens variaram de 0 a 53. Quando incluídas as áreas de maior densidade, variaram de 1 a 92 parasitos. As amastigotas (Figura 17) foram observadas em células de Kupffer, nos macrófagos de agregados celulares no parênquima, nos infiltrados de veia central e espaço porta e granulomas de veia central, espaço porta e intrassinusoidais. O ponto de maior densidade de amastigotas de *Leishmania* foi situado no parênquima, vistos em seis (50%) dos casos. A mediana da carga parasitária nas amostras foi de 0,13 e, quando incluídos campos de maior densidade foi 0,34. Nos assintomáticos foi observada de nenhum a um parasito, enquanto sintomáticos de zero a 92 amastigotas.

5.3.2. Baço

Nos baços foram visualizadas formas amastigotas de *Leishmania* em 10 dos 14 fragmentos submetidos ao procedimento imunistoquímico. Nas imagens capturadas, foram vistos de zero a 54 amastigotas e nos pontos de maior densidade parasitária de 3 a 94. Os pontos de maior densidade de *Leishmania* estavam localizados em região central do baço, evidenciados em 7 (70%) dos casos onde houve marcação. Foram observadas amastigotas em infiltrado da cápsula e macrófagos da polpa vermelha. A mediana da carga parasitária nos animais sem o *hotspot* foi de 1,5 e quando incluídos os pontos de maior densidade foi de 2,04 amastigotas. Em assintomáticos não foram vistas amastigotas no baço em nenhum dos campos, e nos sintomáticos de 0 a 94 parasitos.

5.3.3. Linfonodo

Nos cortes avaliados de linfonodo, 12 dos 14 exibiram marcação com um ou mais parasitos. Nos pontos de contagem ocasionais, verificou-se de 0 a 30 parasitos, já nos *hotspots*, esta variação foi de 2 a 41. Os seios subcapsulares dos linfonodos foram os que mais frequentemente (6/12-50%) apresentavam pontos de maior densidade parasitária. Formas do parasito foram vistas em histiócitos dos seios subcapsulares e medulares e em infiltrado presente na cápsula. A mediana da carga parasitária foi 1,0 e, incluindo os *hotspots* foi de 1,43. Em assintomáticos não foram observados parasitos nas amostras e em sintomáticos de 2 a 41 amastigotas.

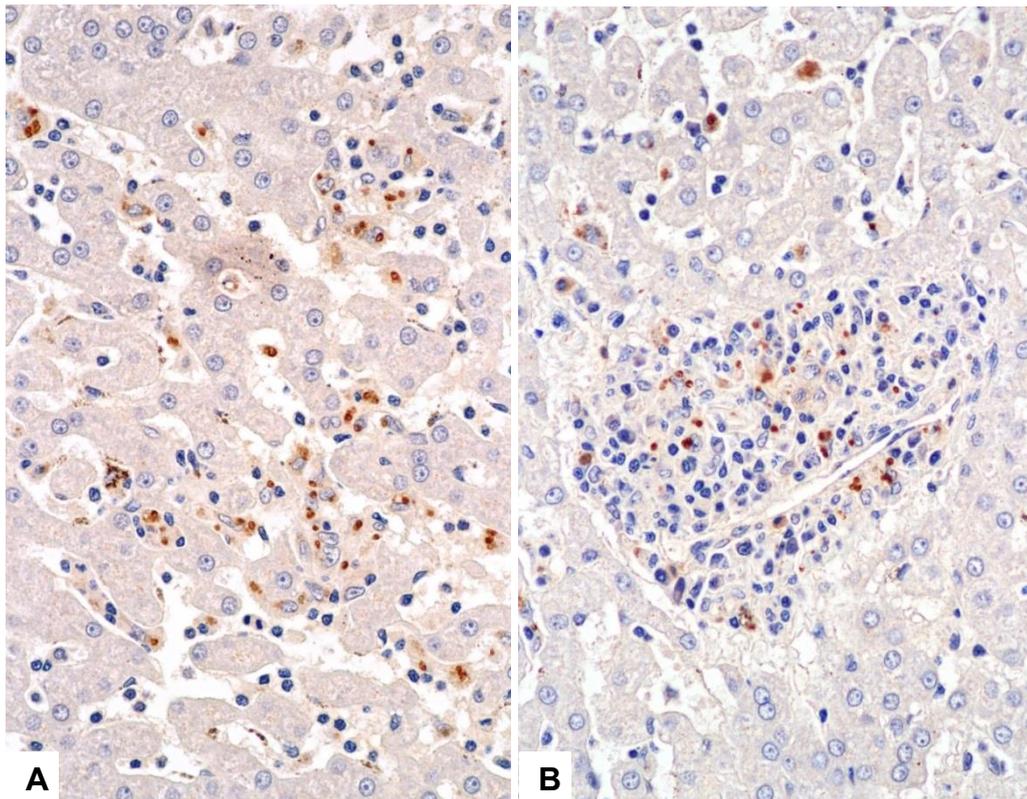


Figura 17. Fotomicrografia de marcação por imunistoquímica em cão naturalmente infectado do município de Jequié-Ba. (A, B) Fragmentos hepáticos revelando numerosos parasitos. Aumento 400x.

6. DISCUSSÃO

No estudo descrevemos de maneira pormenorizada e sistemática alterações histopatológicas ocorridas em cães de área endêmica e portadores de *Leishmania infatum/chagasi*, correlacionando esses achados com as manifestações clínicas da doença e, observamos ainda, a intensidade de parasitismo nos cães com infecção ativa, positivos nos três testes, no fígado, no baço e no linfonodos. No fígado, a presença de infiltrado mononuclear em proporções variáveis em região portal e veia central, presença de granulomas, hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer, linfocitose intrassinusoidal, congestão sinusoidal, esteatose, balonização, focos de necrose hepatocítica e formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram encontrados nos fragmentos de tecido analisados. No baço, os folículos moderadamente desorganizados foram os mais frequentes na população geral. Ainda no órgão, foram notados a presença de precursores hematopoiéticos e aumento do número de plasmócitos nos cordões esplênicos em determinada parcela das amostras. Assim como visto no baço, foi possível verificar plasmocitose nos linfonodos dos cães infectados, sobretudo nos cordões. Plasmocitose, dilatação e histiocitose dos seios subcapsular e medular, e ainda, espessamento dos cordões somaram-se aos achados nos linfonodos. Nefrite intersticial em intensidades variáveis constituiu a alteração mais frequente nos rins dos animais estudados. Na pele dos cães, o principal achado era uma inflamação caracterizada por mononucleares, mais especificamente, linfoplasmocitária de intensidade discreta. Discretas também foram as alterações encontradas em órgãos como intestinos e pulmões. Os fragmentos de pulmão revelaram, em sua maior parcela, sutis quantidades de um infiltrado peribronquiolar linfohistioplasmocitário ou linfoplasmocitário, enquanto que nos intestinos, o tecido normal, sem alterações evidenciáveis ao microscópio ótico, representou o principal resultado das análises histopatológicas.

Assim como verificado neste estudo, Silva et al (2013) descreve como as alterações mais frequentes nos indivíduos infectados a linfadenopatia, perda de peso, esplenomegalia, anemia e alterações cutâneas como úlceras e onicogribose que são reafirmadas por outros autores (CIARAMELLA et al, 1997).

Com relação aos achados nos órgãos, alterações intensas em diferentes segmentos intestinais de cães infectados têm sido relatadas. A presença de inflamação crônica, evidenciada por um infiltrado mononuclear, do tipo linfocitoplasmocitário, com macrófagos atípicos, é encontrada na mucosa e submucosa intestinal. Por vezes, esse padrão inflamatório é permeado por polimorfonucleares e ainda pode ser visto formas amastigotas ao exame em HE (SILVA et al, 2002) e detectadas em quantidades consideráveis na mucosa de cães infectados (PINTO et al, 2011). Animais com manifestações clínicas distintas têm demonstrado enterite com características semelhantes entre os grupos (PINTO et al, 2011; FIGUEIREDO et al, 2013). Esses resultados destoam, em parte, ao que foi verificado em nossa pesquisa, que encontrou, quase em toda sua totalidade, fragmentos normais do órgão com níveis baixíssimos de parasitismo, no entanto sem diferenças quanto aos achados entre assintomáticos e sintomáticos.

Já no que tange aos pulmões dos indivíduos naturalmente infectados e observados nesse estudo, estes exibiram, com frequência, a presença de infiltrado peribronquial e peribronquiolar do tipo linfoplasmocitário ou linfocitoplasmocitário, corroborando com os achados previamente constatados por Alves et al (2010) em seu trabalho com cães advindos de dois estados endêmicos para leishmaniose no Brasil. Pneumonia intersticial, com espessamento de septos por acréscimo de material fibrótico-celular vem sendo descrito na literatura corrente, com mononucleares como os principais envolvidos pela parcela inflamatória e com pequena expressão, em alguns casos, neutrófilos e eosinófilos (GONÇALVES et al, 2003; SILVA et al, 2013; PINTO et al, 2013). Nas análises obtidas em nossa pesquisa, em apenas um animal classificado como sintomático, foi encontrado espessamento fibroso multifocal e discreto dos septos e não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as manifestações clínicas nos critérios analisados para o órgão.

Embora Gonçalves et al (2003) relate não haver diferenças entre sintomáticos ou assintomáticos, alta frequência de pneumonia intersticial foi constatada dentre os animais avaliados da pesquisa conduzida por ele. Muitos estudos que analisam alterações histopatológicas nos pulmões e outros órgãos de cães infectados, incluindo o nosso, utilizam animais errantes, obtidos de inquéritos epidemiológicos

que, por vezes, são mantidos temporariamente em centros de controle de zoonoses (ALVES et al, 2010; MELLO et al, 2008; GIUNCHETTI et al, 2006). Ocorre que, cães infectados por *Leishmania sp.* têm susceptibilidade aumentada a infecções oportunistas (SILVA, 2004) o que pode acontecer com complexo respiratório infeccioso canino ou tosse dos canis, causada por uma gama de agentes. Infecções deste tipo são conhecidas por possuírem elevada morbidade além de, a depender da evolução, vir a desenvolver quadros de pneumonia broncointersticial (MCGAVIN e ZACHARY 2013) que pode se assemelhar aos conferidos aos animais com a infecção pelo protozoário. No nosso caso, os animais não foram submetidos a tempo prolongado de confinamento, não possibilitando a evolução de outras infecções geradas pelo adensamento da população de cães.

Baixos índices de parasitismo foram encontrados na pele dos animais do nosso estudo, cerca de 9,5% dos casos. Alto parasitismo cutâneo em cães têm sido referenciado em indivíduos infectados, mormente em tecidos colhidos de orelhas (COSTA et al, 2008), porém dados distintos foram vistos em outras pesquisas que apontam baixo ou nenhum parasita nas amostras de pele (TAFURI et al., 2001). Estudos anteriores sugerem que o padrão inflamatório podem interferir na presença ou ausência de amastigotas de *Leishmania sp.* O padrão granulomatoso e com macrófagos monomórficos são, em maior frequência, associados existência de formas do parasito do que infiltrado com características difusa e focal (DOS-SANTOS et al, 2004). Os fragmentos de orelhas analisados na presente pesquisa constantemente apresentavam uma dermatite multifocal, discreta, linfoplasmocitária, com infrequente visualização de amastigotas de *Leishmania*, fato que corrobora com os achados de Dos-Santos et al (2004). Animais clinicamente afetados e assintomáticos do nosso estudo não evidenciaram diferenças estatísticas entre os grupos quanto a questões de ordem qualitativas e quantitativas de infiltrado ou ainda de tipo de infiltrado e padrão de distribuição, o que difere, em parte, do encontrado por Solano-Gallego et al (2004) que relata uma maior frequência de inflamação nos sintomáticos, porém os cães utilizados no estudo conduzido por ele, são sintomáticos com altos títulos e assintomáticos com baixos títulos de anticorpos, ou seja, um critério de seleção diferente do nosso.

Infiltrado inflamatório em interstício renal, sobretudo no córtex renal, demonstra ser um achado constante entre os cães acometidos pela infecção por *L. chagasi*, em indivíduos sintomáticos ou assintomáticos, fato visto neste trabalho e já relatado em estudos anteriores (NIETO et al, 1992; RIGO et al, 2013). Os tipos celulares que predominam nas nefrites desses animais são essencialmente linfócitos e plasmócitos, em distribuição geralmente multifocal ou focal que por vezes, aparece circundando glomérulos (POCAI et al, 1998; BURNA et al, 2010; COSTA et al, 2013). A alteração glomerular mais visualizada nesta pesquisa nos animais infectados nas distintas manifestações foi a glomerulonefrite membranoproliferativa, o que corrobora com as análises realizadas anteriormente por outros autores (COSTA et al 2003; SILVA et al, 2013). Os dados obtidos neste estudo, de uma forma global, são muito semelhantes aos descritos por Ferrari et al (2010) que relata como mais frequente a glomerulonefrite membranoproliferativa e altas frequências de nefrite intersticial linfoplasmocitária raramente associada a presença de amastigotas de *Leishmania*.

Inflamação mononuclear em região portal e em torno de veia central vem sendo descritas em cães naturalmente infectados, independente de manifestação clínica. Amostras de tecido hepático evidenciam múltiplos focos de infiltrado, principalmente do tipo linfoplasmocitário. A presença de granulomas foi também relatada anteriormente por outros autores, além de hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer e ainda processos degenerativos e acúmulos de pigmentos. Esteatose e balonização apontam como os processos degenerativos mais frequentes e como acúmulo de pigmentos, o mais visto, eram os pigmentos de hemossiderina que eram encontrados contidos em células de Kupffer e em macrófagos dos granulomas (TAFURI et al, 2001; RALLIS et al, 2005; BURNA et al, 2010) As alterações encontradas em nosso estudo dão ênfase e ratificam os dados já vistos já que parece não haver muita discordância no que tange as características encontradas nos fragmentos hepáticos, no entanto, há poucos estudos relacionando os achados de histopatologia nas diferentes manifestações clínicas. Em pesquisas conduzidas por Sant'Ana et al. (2007), a presença de granulomas foi indicada como mais frequente em cães assintomáticos do que em sintomáticos, mas ainda sim, não houve diferença expressiva. Em nosso estudo, diante dos todos critérios analisados, somente a linfocitose intrassinusoidal se mostrou diferente entre os grupos,

demonstrando maior frequência da intensidade moderada nos animais sintomáticos. Nos demais parâmetros, não se pode determinar diferenças nas análises estatísticas que fossem significativas nos objetos avaliados. Outros estudos indicam essa mesma tendência (MELLO et al, 2008; SANT'ANA et al, 2007). A linfocitose encontrada nos sinusoides dos animais da nossa pesquisa pode ter associação com a linfocitose em sangue periférico descrito em cães infectados e relatados por THOMAZ-SOCCOL et al (2009).

Em nossa análise, foram notados em pouco mais de um terço dos casos, minimamente mais frequente nos animais sintomáticos que nos assintomáticos, um espessamento e presença de uma inflamação com característica crônica na cápsula esplênica. Nossos dados mostram consonância com os achados previamente relatados por outros autores que evidenciam esse espessamento e periesplenite essencialmente por mononucleares (TASCA et al, 2009; SILVA et al, 2013).

Na população geral, a polpa branca dos baços avaliados, em sua maioria, mostrou-se em grau de desorganização moderado, com características de definição folicular pouco precisas, onde não era possível determinar claramente o centro germinativo, zona do manto e zona marginal. Os assintomáticos exibiram maior percentual de baços com folículos do tipo bem organizado, fato já indicado em outros estudos que relacionam a gravidade da manifestação da doença com desestruturação da polpa branca esplênica (LIMA et al, 2014).

A presença de granulomas, como evidenciado em outros estudos, não foi um achado entre os animais avaliados na nossa pesquisa, no entanto pode-se perceber em meio à polpa vermelha, um aumento claro do número de plasmócitos nos cordões esplênicos, assim como a demonstração de outros tipos celulares como precursores hematopoiéticos e granulócitos. Dados fornecidos por Santana et al (2008) discorrem sobre a presença de megacariócitos e granulócitos com um aumento numérico significativo de plasmócitos entre indivíduos infectados e não infectados.

Já nos linfonodos relata-se na literatura a ocorrência na cápsula de espessamento com deposição de colágeno e acúmulo de células mononucleares, sobretudo macrófagos. As amostras de cães portadores da infecção por *L. chagasi*

revelam hipertrofia de zonas cortical e medular com região medular preenchida em maior proporção por macrófagos e em menor número plasmócitos e linfócitos médios e grandes. Os cordões medulares mostram-se hipertrofiados, espessados, enquanto os seios medulares encontram-se dilatados (SILVA et al, 2013; PINTO et al, 2013). Dados semelhantes foram vistos por nós em nossa pesquisa, que ainda encontrou, principalmente em meio aos cordões, plasmocitose, em certa parcela, com grau expressivo de células. Nossos achados estão de acordo com o verificado por LIMA et al (2004) que relata alto percentual dessas células, e assim como visto por nós, o autor não pode associar a intensidade das lesões observadas a formas clínicas apresentadas pelos cães.

Estudos com amostras de linfonodos que buscaram avaliar a correlação entre grau de lesão cutânea e intensidade de parasitismo em linfonodo regional, demonstraram haver uma ligação entre os dois fatores (COSTA et al, 2008). A carga parasitária estudada de forma comparativa entre órgãos de cães sintomáticos e assintomáticos tem sido alvo de investigações com diferentes abordagens. Autores apontam evidências que animais sintomáticos teriam maior carga parasitária que assintomáticos em órgãos como fígado e baço. O órgão com maior número de leishmanias, contados pelo método LDU (*Leishman Donovan units*), foi descrito como o fígado, seguido pelo baço (SANCHEZ et al, 2004). Qualitativamente, em nosso estudo, fígado e linfonodo aparecem como mais frequentemente parasitados, porém, em um método utilizando área fixa realizado por nós, o tecido esplênico aparece como mais parasitado quantitativamente, porém, pelo pequeno número amostral não foi possível realizar métodos estatísticos para outras comparações.

Nossos achados estão de acordo com os verificados por Reis et al (2006) que encontrou maior índice de parasitismo no baço que em órgãos como fígado e linfonodo poplíteo, o entanto empregando análises pelo método LDU em esfregaços corados.

Nossa pesquisa, diferentemente de outras, levou em consideração vários sistemas, possibilitando avaliar quase que globalmente os animais. Pesquisas futuras, no sentido de compreender outras possíveis co-morbidades nas populações avaliadas e utilizar métodos que viabilizem comparações mais próximas, análises sistemáticas e com ênfase, sobretudo em órgãos como pulmões e intestinos, podem

ajudar a elucidar e entender as alterações nos animais das áreas endêmicas. Muitos pontos de dissonância na literatura quanto a tópicos em alguns órgãos são vistos ainda, sendo necessárias maiores investigações no que diz respeito às diferenças dessas alterações e suas relações com a manifestação clínica e a carga parasitária.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos critérios analisados, em termos qualitativos e quantitativos, as alterações histopatológicas não diferem em animais sintomáticos e assintomáticos infectados com *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

- ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; RALLIS, T. S.; KOYTINAS, A. F.; TONTIS, D.; PLEVRAKI, K.; KRITSEPI, M. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: A prospective study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 1, p. 53-57, 2007.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; DA SILVA JÚNIOR, G. B.; FREIRE, C. C. F.; DE CASTRO OLIVEIRA, S. B.; ALMEIDA, D. M.; DA SILVA, H. F.; DO SOCORRO CAVALCANTE, M.; DE QUEIROZ SOUSA, A. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 26, n. 4, p. 330-333, 2009.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v. 57, p.1-88, 2004.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. D.; THE, W. H. O. L. C. T. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVES, G. B. B.; PINHO, F. A.; SILVA, S. M. M. S.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, F. A. L. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 310-315, 2010.
- BACELLAR, O. V.; D'OLIVEIRA JR, A.; JERÔNIMO, S.; CARVALHO, E. M. IL-10 AND IL-12 ARE THE MAIN REGULATORY CYTOKINES IN VISCERAL LEISHMANIASIS. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, 2000.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.

BEVILACQUA, P. D.; PAIXÃO, H. H.; MODENA, C. M.; CASTRO, M. C. P. S. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, p. 1-8, 2001.

BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K.; GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 4, 2011.

BORGES, B. K. A. S., J.A. ; HADDAD, J.P.A. ; MOREIRA, E.C.; MAGALHÃES, D.F.; RIBEIRO, L.M.L.; FIÚZA, V.O.P. . Presença de animais associada ao risco de transmissão da leishmaniose visceral em humanos em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1035-1043, 2009.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. EPIDEMIOLOGICA**, D. D. V. N. Brasília: Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde 2006.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. EPIDEMIOLOGICA**, D. D. V. N. Brasília: Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde 2014.

BURNA, A. N.; ALVAREZ, J. D.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M.; MAIDANA, H. R. Histopathologic confirmation of visceral leishmaniosis in a dog from Corrientes, Argentina. **Revista Veterinaria**, v. 21, n. 2, p. 148-150, 2010.

CAMPINO, L.; MAIA, C. Epidemiology of leishmaniases in Portugal. **Acta Medica Portuguesa**, v. 23, n. 5, p. 859-864, 2010.

CARREIRA, J. C.; DA SILVA, A. V.; DE PITA PEREIRA, D.; BRAZIL, R. P. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 111, 2012.

CHATZIS, M. K.; ANDREADOU, M.; LEONTIDES, L.; KASABALIS, D.; MYLONAKIS, M.; KOUTINAS, A. F.; RALLIS, T.; IKONOMOPOULOS, J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues

of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 217-225, 2014.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361-372, 1990.

COSTA, F. A. L.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C. B.; SILVA, S. M. M. S.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p. 677-684, 2003.

COSTA, J. M. L. V., G. M. C.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; ALVIM, A. C.; BURATTINI, M. N. & SILVA, A. R. Visceral Leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil: Evolution of an Epidemic. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 2, p. 321-324, 1995.

COSTA, M. M.; LIMA, W. G.; FIGUEIREDO, M. M.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L. Cervical, mandibular, and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a histopathologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. **Veterinary Pathology**, v. 45, n. 5, p. 613-616, Sep 2008.

COSTA, P. L.; DANTAS-TORRES, F.; DA SILVA, F. J.; GUIMARAES, V. C.; GAUDENCIO, K.; BRANDAO-FILHO, S. P. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 126, n. 2, p. 99-102, May 2013.

DA SILVA, S. M.; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M. First report of vertical transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1-2, p. 159-162, 2009.

DAHROUG, M. A.; ALMEIDA, A. B.; SOUSA, V. R.; DUTRA, V.; TURBINO, N. C.; NAKAZATO, L.; DE SOUZA, R. L. Leishmania (Leishmania) chagasi in captive wild felids in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 1, p. 73-74, Jan 2010.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DIAS, F. O. P. L., E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, set-out 2003.

DINIZ, S. A.; SILVA, F. L.; CARVALHO NETA, A. C.; BUENO, R.; GUERRA, R. M. S. N. C.; ABREU-SILVA, A. L.; SANTOS, R. L. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 24-33, feb 2008, 2008.

DOS-SANTOS, W. L.; DAVID, J.; BADARO, R.; DE-FREITAS, L. A. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. **Parasitol Res**, v. 92, n. 2, p. 89-94, Jan 2004.

DYCE, K.M., SACK, W.O. & WENSING, C.J.G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

EL HAG, I. A.; HASHIM, F. A.; EL TOUM, I. A.; HOMEIDA, M.; EL KALIFA, M.; EL HASSAN, A. M. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 6, p. 547-551, 1994.

FERRARI, H. F. C., VINÍCIUS SOARES; MOREIRA, MARCIO ANTONIO BATISTELA; DA MATTA, VANIA RIBEIRO; HAGA, CLÁUDIO HIROYASSU; LUVIZOTTO, MARIA CECÍLIA RUI. Morphological, Immunohistochemical and molecular study of renal lesions in canine visceral leishmaniasis (CVL). **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 1, p. 123-131, 2010.

FERRER, L.; JUANOLA, B.; RAMOS, J. A.; RAMIS, A. Chronic colitis due to leishmania infection in two dogs. **Veterinary Pathology**, v. 28, n. 4, p. 342-343, 1991.

FIGUEIREDO, M. M.; DEOTI, B.; AMORIM, I. F.; PINTO, A. J. W.; MORAES, A.; CARVALHO, C. S.; DA SILVA, S. M.; DE ASSIS, A. C. B.; DE FARIA, A. M. C.; TAFURI, W. L. Expression of regulatory T cells in jejunum, colon, and cervical and mesenteric lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3704-3712, 2014.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DE DONCKER, S.; DUJARDIN, J.-C.; VAN DER AUWERA, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 238-245, 2010.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.

FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 19, n. 1, p. 15-24, jan-mar 2010.

GHINATO, L. M., FCL; ALVES, LC; TAFURI, VL ; FIGUEIREDO, MM ; TORRES, SM; PIMENTEL, DS. Alterações estruturais e marcação imunohistoquímica do parasitismo no intestino de cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908). **Medicina Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 9-13, 2011.

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, n. 1-2, p. 23-33, 2008.

GONÇALVES, R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N. D.; RASO, P.; TAFURI, W. L. Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*: a histopathological and morphometric study. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 45, p. 153-158, 2003.

GONTIJO, C. M. F. M., M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KONDO, K. R. J.; FONSECA, C. C.; MATTA, S. L. P. D.; VILORIA, M. I. V. Análise histomorfométrica da matriz extracelular do linfonodo poplíteo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 610-616, 2009.

LIMA, I. S.; SILVA, J. S.; ALMEIDA, V. A.; JUNIOR, F. G.; SOUZA, P. A.; LARANGEIRA, D. F.; MOURA-NETO, J. P.; FRAGA, D. B.; DE FREITAS, L. A.; DOS-SANTOS, W. L. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87742, 2014.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N. D.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, n. 1, p. 43-53, 2004.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C. C.; SILVA, T. M. A.; SILVA, F. L.; MOTTA, R. O. C.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1–2, p. 146-151, 2008.

MALARKEY, D. E.; JOHNSON, K.; RYAN, L.; BOORMAN, G.; MARONPOT, R. R. New insights into functional aspects of liver morphology. **Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 1, p. 27-34, 2005.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V. F.; MICHELE, P. L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 271-280, 2006.

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, Apr 30, 2007.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.

MCGAVIN, D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 8, p. 606-616, 2005.

MELO, F.; AMARAL, M.; OLIVEIRA, P.; LIMA, W.; ANDRADE, M.; MICHALICK, M.; RASO, P.; TAFURI, W. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 2, p. 198-204, 2008.

MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A. E.; MACIEL, G.; MICHALSKY, E.; DIAS, E. S. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 1, p. 76-78, 2011.

MONTEIRO, É. M.; FRANÇA DA SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; CAMARGOS COSTA, D.; ANDRADE BARATA, R.; DE PAULA, E. V.; LINS MACHADO-COELHO, G. L.; FONSECA ROCHA, M.; LATORRE FORTES-DIAS, C.; SANTOS DIAS, E. Visceral leishmaniasis: A study on phlebotomine sand flies and canine infection in Montes Claros, State of Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, 2012.

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

NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1-2, p. 33-47, Dec 1992.

NUNES, C. M.; LIMA, V. M. F. D.; PAULA, H. B. D.; PERRI, S. H. V.; ANDRADE, A. M. D.; DIAS, F. E. F.; BURATTINI, M. N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1–2, p. 19-23, 2008.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A.; DE OLIVEIRA, O.; DE OLIVEIRA, G. R.; ESPINDOLA, I. A.; DORVAL, M. E.; BRAZIL, R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 869-874, Dec 2006.

PARADIES, P.; SASANELLI, M.; DE CAPRARIIS, D.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; LIA, R. P.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet J**, v. 186, n. 3, p. 370-373, Dec 2010.

PARANHOS-SILVA, M.; OLIVEIRA, G. G.; REIS, E. A.; DE MENEZES, R. M.; FERNANDES, O.; SHERLOCK, I.; GOMES, R. B.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 97-111, May 30 2003.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 120-127, 2002.

PENNISI, M. G. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 35-47, 2015.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINTO, A. J. W.; FIGUEIREDO, M. M.; FERREIRA, R. A.; CALIARI, M. V.; TAFURI, W. L. Unusual small intestine inflammatory lesions in a dog with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 6, n. 1, p. 19-25, 2013.

PINTO, A. J. W.; FIGUEIREDO, M. M.; SILVA, F. L.; MARTINS, T.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 53, n. 1, 2011.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Leishmaniose visceral (Calazar): cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil/Visceral Leishmaniasis (kala-azar): five cases in dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. **Ciência Rural**, p. 501-505, 1998.

RALLIS, T.; DAY, M. J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ADAMAMA-MORAITOU, K. K.; PAPAZOGLU, L.; FYTIANOU, A.; KOUTINAS, A. F. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **J Comp Pathol**, v. 132, n. 2-3, p. 145-152, Feb-Apr 2005.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends Parasitol**, v. 26, n. 7, p. 341-349, 2010.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3-4, p. 102-116, 2006.

ROLÃO, N.; MARTINS, M. J.; JOÃO, A.; CAMPINO, L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite**, v. 12, n. 2, p. 183-186, 2005.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 1, p. e584, 2010.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

ROSYPAL, A. C.; TROY, G. C.; ZAJAC, A. M.; FRANK, G.; LINDSAY, D. S. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in

an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970-972, 2005.

SANCHEZ, M. A.; DIAZ, N. L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F. J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, n. 6, p. 618-624, Jun 2004.

SANT'ANA, J. A. P.; LIMA, W. G.; OLIVEIRA, M. R.; SIMÕES, L. A.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1137-1144, 2007.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A. R.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. C. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515-524, 2008.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

SILVA, F. L.; TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, W. L. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: a case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 340-344, 2002.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SILVA, L. C.; CASTRO, R. S.; FIGUEIREDO, M. M.; MICHALICK, M. S.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **Int J Exp Pathol**, v. 94, n. 2, p. 133-143, Apr 2013.

SILVA, K. L. O.; DE ANDRADE, M. M. C.; MELO, L. M.; PEROSSO, J.; VASCONCELOS, R. O.; MUNARI, D. P.; LIMA, V. M. F. CD4+FOXP3+ cells produce IL-10 in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**, v. 202, n. 3-4, p. 313-318, 2014.

SINAN/SVS/MS. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. 2014.

SOARES, M. J. V.; MORAES, J. R. E.; PALMEIRA BORGES, V.; MIYAZATO, L. G.; MORAES, F. R. Renal involvement in visceral leishmaniasis dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, p. 579-593, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and Immunohistochemical Study of Clinically Normal Skin of Leishmania infantum-infected Dogs. **J Comp Pathol**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

SOUZA, N. P.; ALMEIDA, A. D. B. P. F. D.; FREITAS, T. P. T. D.; PAZ, R. C. R. D.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 333-335, 2010.

SOUZA, T. D.; TURCHETTI, A. P.; FUJIWARA, R. T.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 3-4, p. 233-241, 2014.

SUVISA/DIVEP. **Boletim epidemiológico da leishmaniose visceral (LV)**. Estado da Bahia, 2013. EPIDEMIOLÓGICA, D. D. V. 2013. Disponível em: http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/boletim%20de%20leishmaniose%20visceral_menores%205anos_2008%20a%202012.pdf Acesso: 02 março 2015

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniosis: A remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 203-212, 2001.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. D. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M. An alternative immunohistochemical method for

detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TASCA, K. I.; BUZETTI, W. A. S.; TENORIO, M. S.; PAULAN, S. C.; LIMA, F. L.; DE QUEIROZ, N. M. G. P.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NEVES, M. F.; DE NORONHA JR, A. C. F.; DE ASSIS, J. Parasitological, immunohistochemical and histopathological study for *Leishmania chagasi* detection in splenic tissues of dogs with visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2009.

THOMAZ-SOCCOL, V. ; CASTRO, E. A. ; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; SOUZA, L. M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S. ; MEMBRIVE, N. A.; MINOZZO, J. C.; TRUPPEL, J. ; BUENO, W.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 46-51, jul.-set. 2009.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitol Res**, v. 109, n. 4, p. 1051-1057, 2011.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am J Trop Med Hyg**, v. 64, n. 3-4, p. 119-124, Mar-Apr 2001.